

仅限科研/Only Research

版本号: 202301

2X Sdfusion master mix

产品内容

名称	货号	规格	保存
2X Sdfusion master mix	SDM0013	5*1mL	-20°C

产品描述

2X Sdfusion master mix 能够为大部分 PCR 应用同时提供高保真性, 强大的扩增能力和更快的延伸速度。Sdfusion DNA 聚合酶由 Pyrococcus 样校正聚合酶与 DNA 结合结构域融合形成。其独特的结构, 一种新型 Pyrococcus 样酶与具有增强合成能力的结构域融合, 提高了保真度和延伸速度。高保真度使得 Sdfusion DNA 聚合酶成为分子克隆或其他后续应用的较优选择。Sdfusion DNA 聚合酶是具有最高的保真度的 DNA 聚合酶中的一个, 其错误率比 Taq DNA 聚合酶低 50 倍, 比 Pyrococcus Furious DNA 聚合酶低 6 倍。

Sdfusion DNA 聚合酶具有 5' → 3' 聚合酶活性和 3' → 5' 外切酶活性。它会在扩增产物两端产生平端, 而没有 A 突出(A 突出通常出现在用 Taq 聚合酶扩增的产物中)。在实验中我们的 Sdfusion 聚合酶能够扩增长达 20.1kb 的基因组片段。在 PCR 反应中, Sdfusion DNA 聚合酶的延伸速率约为 15-30sec/kb (取决于基因的复杂性)。

操作流程

1. 在冰上进行实验操作我们建议将所有反应组分放在冰上。打开产品后确认全部解冻, 以确保均一性。

组分	20uL 体系	50uL 体系	终浓度
ddH2O	To 20 μL	To 50 μL	
10uM Forward Primer	0.8uL	2uL	0.4uM
10uM Reverse Primer	0.8uL	2uL	0.4uM
Template variable	variable	variable	<250ng
2X Sdfusion master mix	10uL	25uL	1X

A. 推荐的最终引物浓度为 0.4uM, 但可以在 0.2-1.0uM 范围内变化, 您可以调整浓度。一般推荐寡核苷酸引物长度在 20-40bp 之间, 理想的 GC 含量为 40-60%。

B. 使用高质量纯化的 DNA 模板可以大大提高 PCR 反应的成功率。对于低复杂度 DNA (例如质粒, 病毒, λ 或 BAC DNA), DNA 模板量可以在每 50 μL 反应体积 1pg-10ng 之间。对于高复杂度的基因组 DNA, 每 50 μL 反应体积 DNA 模板量应为 50-250ng。如果从 cDNA 合成反应中获得模板 DNA, 则模板的体积不应超过最终 PCR 反应体积的 10%。

2. 轻柔的混匀反应体系, 并在离心机中离心。实验者应迅速混合并离心 PCR 管, 并将反应体系转移至预热至变性温度 (98°C) 的 PCR 仪。如果 PCR 仪没有热盖, 请使用矿物油覆盖



样品。

3. PCR 循环条件

	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98°C	30sec-1min	1
Denaturation	98°C	10sec	variable
Annealing	55-58°C	15-30sec	
Extension	72°C	15 - 30sec/kb	
Final extension	72°C	2min	1
Hold	4°C	+∞	1

A. 对于 ≤ 10 kb 模板, 我们建议在 98° C 下进行 30sec 的预变性。对于 ≥ 10 kb 的模板, 我们建议在 98°C 下进行 1min 的预变性。

B. SDFusion DNA 聚合酶的最佳退火温度可能与基于 Taq 的聚合酶明显不同。SDFusion DNA 聚合酶具有稳定引物-模板杂交的能力。通常建议在 55-58° C 下退火 15 - 30S。如果在该温度下没有获得理想的产物或产量, 请使用温度梯度为每种模板-引物对组合找到最佳退火温度。

C. 延伸时间取决于扩增子的长度和复杂性。对于低复杂度的 DNA (例如质粒, 病毒, λ 或 BAC DNA), 每 1kb 使用 15 秒的延伸时间。对于高复杂度的基因组 DNA, 建议每 1kb 30S。对于一些 cDNA 模板, 延伸时间可以增加至每 1kb 40S, 以获得最佳结果。(对于大部分模板, 可以使用每 1kb 20S。)

4. 电泳如果需要对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 我们的产品 GelRed (Cat:SDM0006) 可供您选择。

注意事项

1. SDFusion 聚合酶退火温度不同于许多常见的 DNA 聚合酶 (如 TaqDNA 聚合酶)。有关于酶的退火温度的设置, 我们推荐 55-58°C。如果在该温度下, 您无法获得较为理想的实验结果, 可以尝试设置梯度退火温度, 以优化实验条件。

2. 建议使用 15-30sec/kb 的扩展速度, 但不要超过 1 分钟/kb。

3. SDFusion DNA 聚合酶产生平末端 DNA 产物。

4. SDFusion DNA 聚合酶的聚合能力较强, 实验者在 PCR 的整个实验过程中请在冰上操作, 否则室温下酶具有活性, 有可能将引物聚合形成引物二聚体, 引物消耗后, PCR 效率将会降低。

5. 使用 SDFusion DNA 聚合酶产生的 PCR 产物具有平末端。如果下一步是克隆, 那么推荐使用平端克隆。如果您期望选择 T/A 克隆, 那么 DNA 应该在 A 突出加入前纯化 (任何剩余的 SDFusion DNA 聚合酶将降解 A 突出, 再次产生平端)。可以用 Taq DNA 聚合酶或 Klenow exo-酶添加无模板的 A 突出。实验者可以在 10 μ L 反应混合物中用 1xTaq 缓冲液, 2.5mMMgCl₂, 0.2mM dATP 和 1U TaqDNA 聚合酶在 72°C 孵育 30 分钟。

