



2×SuperPlus Pfx Master Mix

Cat.No. CW3419

产品简介

2×SuperPlus Pfx Master Mix包含经过改造后的Super Pfx DNA Polymerase热启动酶、dNTP、独特的延伸因子、特异性促进因子以及高性能的缓冲体系，具有优越的扩增能力、扩增特异性，同时兼容部分粗品基因组DNA扩增。SuperPlus Pfx DNA Polymerase是一种经过高通量筛选改造的超高保真DNA聚合酶，保真性约为普通Taq DNA聚合酶的240倍。本产品中含有单克隆抗体，可进行高特异性的热启动PCR。2×Master Mix 用于PCR反应时只需加入引物和模板即可进行PCR扩增反应，减少了复杂的加样过程，提高检测通量、结果的重复性和稳定性。

本试剂盒适用于对保真度要求高的PCR扩增、扩增得到的PCR产物的3'端不带有“A”碱基，可直接克隆于平末端载体中。

保存条件

-20±5℃保存

产品内容

Component	CW3419S 1 mL	CW3419M 5 mL
2×SuperPlus Pfx Master Mix	1×1 mL	5×1 mL
ddH ₂ O	1×1 mL	5×1 mL

使用说明

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

PCR 反应体系

所有操作请在冰上进行，组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20℃保存。

组分	25 μL反应体系	50 μL反应体系	终浓度
2×SuperPlus Pfx Master Mix	12.5 μL	25 μL	1×
Forward Primer, 10 μM	0.5-1 μL	1-2 μL	0.2-0.4 μM
Reverse Primer, 10 μM	0.5-1 μL	1-2 μL	0.2-0.4 μM
Template DNA 适量	可变量	可变量	≤500 ng
ddH ₂ O	up to 25 μL	up to 50 μL	

PCR 反应程序

步骤	温度	时间	
预变性	98℃	30s-3 min	
变性	98℃	10-15 s	} 25-35循环
退火	根据引物Tm定	10-15 s	
延伸	72℃	15-30 s/kb	
终延伸	72℃	5 min	

注意:

- 1) 预变性: 对于多数纯化后的模板, 98℃, 30 s-1 min即可; 对于复杂模板可延长预变性时间, 不超3 min。
- 2) 退火: 一般实验中退火温度比引物Tm低1-3℃, 发生非特异性反应时, 适当提高退火温度。如果需要, 可以建立一个温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。对于高Tm的引物, 可以使用两步循环, 将退火和延伸合并为一步。
- 3) 延伸: 对于复杂的基因组样本或粗品基因组, 延伸时间通常为20-30 sec/kb, 对于简单模板(质粒、大肠杆菌等), 延伸时间可缩短至10 sec/kb。
- 4) 循环数: 可根据扩增产物的下游应用设定循环数, 如果循环次数太少, 扩增量不足, 循环次数太多, 错配机率会增加, 所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。

常见问题与解决方案

1. 无扩增产物或扩增产物浓度低
 - 1.1 可适当提高引物浓度;
 - 1.2 设置梯度退火, 找到合适退火温度;
 - 1.3 适当增加延伸时间或增加PCR循环数;
 - 1.4 调整模板使用量或使用高纯度模板;
 - 1.5 优化引物设计。
2. 非特异较多或条带弥散
 - 2.1 尝试提高退火温度;
 - 2.2 使用两步法或Touch down PCR程序
 - 2.3 适当降低引物浓度;
 - 2.4 减少循环数;
 - 2.5 调整模板使用量或使用高纯度模板;
 - 2.6 优化引物设计。