**Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase MP1516X**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**

**Size : 100U □ 500U □**

**产品概述**

Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase中添加了独特的延伸因子、特异性促进因子以及平台期解抑制因子，使其在长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量方面得到了大幅度提升。使用λDNA、质粒等简单模板，Mesta-Max可以有效扩增长达40kb的片段；使用基因组DNA等复杂模板，Mesta-Max可以扩增长达20kb的片段；使用cDNA模板，Mesta-Max可以有效扩增长达10kb的片段。其错配率是普通Taq酶的1/53，是Pfu酶的1/6。此外，Mesta-Max对PCR抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接PCR。Mesta-Max中添加了在常温下能够抑制其5’→3’聚合酶活性和3’→5’外切酶活性的两种单克隆抗体，可进行高特异性的热启动PCR。

**单位定义**

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74℃ 30 min内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位(U)。

**实验流程**

1. 普通PCR操作流程

反应体系

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

|  |  |
| --- | --- |
| ddH2O | up to 50 μl |
| 2 × Mesta-Max Buffer | 25 μl |
| dNTP Mix (10 mM each) | 25 μl |
| 上游引物 (10 μM) | 25 μl |
| 下游引物 (10 μM) | 25 μl |
| Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase | 25 μl |
| 模板DNA | 不同模板最佳反应浓度有所不同  |

基因组DNA 50-400 ng，质粒或病毒DNA 10 pg-30 ng，cDNA 1-5 μl (不超过PCR反应总体积的1/10)

反应程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 循环步骤a | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 预变性 | 95℃ | 30 sec/3 min |  |
| 变性 | 95℃ | 15 sec | 25-35 |
| 退火b | 56~72℃ | 15 sec |
| 延伸c | 72℃ | 30-60 sec/kb |
| 彻底延伸 | 72℃ | 5 min |  |

a. 推荐大多数模板的预变性温度为95℃，时间为：质粒或病毒DNA 30 sec，基因组或cDNA 3 min。

b. 请根据引物Tm值设置退火温度。如引物Tm值≥72℃，可删除退火步骤，直接进行后续的延伸步骤(两步法PCR)。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。此外，退火温度直接决定扩增特异性。如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度。

c. 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高。

1. 长片段扩增指南

Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase具有卓越的长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量，在扩增长片段时，若推荐程序不能有效扩增，可尝试下表所示Touch Down两步法PCR：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 预变性 | 95℃ | 3 min |  |
| 变性 | 92℃ | 15 sec | 5 |
| 延伸 | 74℃ | 60 sec/kb |
| 变性 | 95℃ | 15 sec | 5 |
| 延伸 | 72℃ | 60 sec/kb |
| 变性 | 95℃ | 15 sec | 5 |
| 延伸 | 70℃ | 60 sec/kb |
| 变性 | 95℃ | 15 sec | 25 |
| 延伸 | 68℃ | 60 sec/kb |
| 彻底延伸 | 68℃ | 5 min |  |

请使用高质量的模板，若产量较低可适当提高模板投入量；推荐使用长引物。

**注意事项**

1. 请使用高质量的模板。

2. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物和模板。

3. 如需要，可适当提高Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase的使用量，但50 μl体系内酶量建议不要超过2 U。

4. Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase具有较强的校对活性。因此，如扩增产物需要进行TA克隆，加A之前必须进行DNA纯化。

5. 为了防止Mesta-Max Super-Fidelity DNA Polymerase的校对活性降解引物，在配置反应体系时请最后加入聚合酶。

6. 引物设计:

引物3’端最后一个碱基最好为G或者C；

引物3’端最后8个碱基应避免出现连续错配；

引物3’端应避免出现发夹结构；

正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1℃为佳，Tm值调整至55℃-65℃为佳(引物Tm值推荐使用Primer Premier 5进行计算)；

引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算；

引物的GC含量控制在40%-60%之间；

引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域；

引物内部或者两条引物之间避免有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3’端避免有3个碱基以上的互补序列；

引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

**保存条件**

-20℃保存。避免反复冻融。

**常见问题与解决方案**

无产物或产物量少

|  |  |
| --- | --- |
| 引物 | 优化引物设计 |
| 退火温度 | 设置退火温度梯度，找到合适的退火温度 |
| 引物浓度 | 适当提高引物浓度 |
| 延伸时间 | 适当增加延伸时间至30 sec/kb-1 min/kb |
| 循环数 | 增加循环数至35-40个循环 |
| 模板纯度 | 使用高纯度模板 |
| 模板使用量 | 使用量可参照反应体系推荐量并适量增加 |
| 酶使用量 | 适当调整高保真酶的使用量 |

有杂带或弥散条带

|  |  |
| --- | --- |
| 引物 | 优化引物设计 |
| 退火温度 | 尝试提高退火温度并设置退火温度梯度 |
| 引物浓度 | 降低引物浓度至终浓度为0.2 μM |
| 延伸时间 | 有大于目标条带的杂带时可适当减少延伸时间 |
| 循环数 | 减少循环数至25-30个循环 |
| 反应程序 | 使用两步法或Touch down PCR程序 |
| 模板纯度 | 使用高纯度模板 |
| 模板使用量 | 使用量参照反应体系推荐量调整或适当减少 |
| 酶使用量 | 适当减少高保真酶的使用量 |

****

***For Laboratory Use***