

Technical literature is available at: 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°C 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°C保存。

ddH ₂ O	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°C	30 sec/3 min	
变性	95°C	15 sec	25-35
退火b	56~72°C	15 sec	
延伸c	72°C	30-60 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

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

b. 请根据引物T_m值设置退火温度。如引物T_m值≥72°C，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。

2. 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°C	3 min	
变性	92°C	15 sec	5
延伸	74°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	5
延伸	72°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	5
延伸	70°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	25
延伸	68°C	60 sec/kb	
彻底延伸	68°C	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 μ l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T_m值相差不超过1°C为佳,T_m值调整至55°C-65°C为佳(引物T_m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T_m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°C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 μ M
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