

FS™ Mix Direct for Blood

货号: P2071a, P2072a

产品简介

FS™ Mix Direct for Blood 是适合全血模板扩增的 2×浓缩快速高效 PCR 预混合溶液, 含有抗体修饰的热启动型 FS™ Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、缓冲液等 PCR 扩增必需组分 (模板与引物除外)。使用时, 仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行 PCR, 从而可以极大地简化操作过程, 缩短操作时间, 降低污染 (加样次数减少)。FS™ Mix Direct for Blood 的反应体系经过优化处理, 高灵敏度的 FS™ Taq DNA 聚合酶确保处理液中的微量样本得到高效扩增。本产品不用进行繁琐的 DNA 提取, 最大限度减少实验误差和交叉污染; 同时依靠特殊的缓冲体系增强 PCR 扩增的特异性, 保证扩增效果与 DNA 模板扩增效果同样可靠。

FS™ Taq DNA 聚合酶是根据蛋白工程原理, 以 Taq DNA 聚合酶为基础, 研发设计的新一代 DNA 聚合酶。本产品具有类似 KOD 酶的快速扩增能力, 延伸速度为 20s/kb (70~75℃, 简单模板可达 5s/kb)。是普通 Taq DNA 聚合酶的 3 倍, 可缩短一半以上的扩增时间; 同时具备 Taq DNA 聚合酶扩增效率高、适应性广等优点。FS™ Taq DNA 聚合酶使用方法与普通 Taq DNA 聚合酶基本相同, 只需注意适当缩短延伸时间。该酶具有 5'→3'聚合酶活性, 无 3'→5'外切酶活性。扩增产物具有 3'-dA 突出端, 可直接用于 TA 克隆。

产品组成

Component	P2071a	P2072a
2× FS™ Mix Direct for Blood	1 ml	1 ml× 5
超纯水	1 ml	1 ml× 5

本产品分体系中包含溴酚蓝、不含溴酚蓝两类。体系中包含溴酚蓝的产品, PCR 扩增产物可直接电泳检测。

这两类产品的扩增性能无差异。如无特别说明提供体系中包含溴酚蓝的包装。

保存条件

-20℃保存 2 年。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

请于冰上或常温配置反应体系, 体系大小与组分用量与添加顺序可调整:

Ordinal	Component	Volume (50 µl reaction volume)	Final concentration (50 µl reaction volume)
1	2× FS™ Mix Direct for Blood ^[1]	25 µl	1×
2	upstream primer (10 µM) ^[2]	2 µl	0.4 µM
3	downstream primer (10 µM) ^[2]	2 µl	0.4 µM
4	全血	0.5 µl	<1µg
5	超纯水 ^[3]	To 25 µl	-
optional	MgCl ₂ (MgSO ₄)/PCR Enhancer ^[4]	Variable	-

[1] 根据实验需要调整 FS™ Mix Direct for Blood 用量, 降低终浓度可提高反应特异性, 提高终浓度可提高反应效率。

[2] 引物终浓度建议范围: 0.1-1 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[4] 可单独订购 25mM MgCl₂ (Cat. #: P9031) 和 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

大多数模板的快速扩增条件:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94℃	4 min	1
Denaturation	94℃	30 sec	28-40
Annealing	55-68℃ ^[1]	30 sec	
Extension	72℃	Variable ^[2]	
Final Extension	72℃	2 min	1

[1] 退火温度应根据 T_m 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 20 sec/kb 来设最佳。

1kb 简单模板的快速扩增条件:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	15 sec	28-40
Annealing	55-68°C	15 sec	
Extension	72°C	20 sec	
Final Extension	72°C	2 min	1

由于 1kb 简单模板的二级结构简单, 且长度较短, 可同时缩短变性、退火时间至 15s, 以实现快速扩增。

3. 分析结果

反应产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要, 可进行割胶回收。无产物或产物量少的改进措施有: 1 调整退火温度; 2 减少抑制剂的影响, 如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分, 需要高倍稀释 (1: 10000) 后使用; 3 采用乙醇沉降洗脱, 提高模板 DNA 的纯度; 4 使用 PCR 添加剂, 如 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)、MgCl₂ (Cat. #: P9031) 等可提高产量。

操作注意事项

- 1 本产品采用改进的抗体修饰技术, 依赖温度激活 DNA 聚合酶, 能有效抑制非特异性结合, 可在室温下配置反应体系。
- 2 本产品可直接从新鲜或冻存的全血、抗凝全血 (EDTA 或其他抗凝剂)、FTA 卡等样本扩增 DNA。可用于人血或其他动物血液。
- 3 延伸时间视片段长度而定。一般情况, ≤500bp 目的片段延伸 15s, 500bp-1kb 延伸 20s, > 1kb 延伸时间按 20s/kb 计算。
- 4 FS™ Taq DNA 聚合酶具有脱氧核苷酸转移酶活性, 因此在 PCR 产物 3' 末端通常会加上一个多余的脱氧腺嘌呤核苷, 可进行 TA 克隆。
- 5 FS™ Mix Direct for Blood 也可采用常规程序扩增, 扩增产物纯化后可直接用于测序反应。为方便加样, 全血可用 PBS 稀释后加样, 模板用量根据样本、实验要求而定。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间; 上下游引物 3' 末端避免互补, 避免出现 3 个以上重复

的 G 或 C, 或出现发夹结构, 否则会产生非特异性扩增; GC 含量控制在 40-60%, 且上下游引物 GC 含量尽量接近; Tm 值控制在 55-65°C 之间, 且上下游引物 Tm 值尽量接近, 额外附加序列 (酶切位点、修饰等) 是非模板匹配序列, 不参与 Tm 值计算。

本品仅供科学研究使用。