



2× Xerox PCR Master Mix

产品信息:

组成	MT209-01	MT209-02
2× Xerox PCR Master Mix	1ml	1ml×5

产品介绍:

2× Xerox PCR Master Mix 是用高保真聚合酶 Xerox DNA 聚合酶配制而成的 2 倍 PCR 预混液, 包含了 PCR 反应中除引物和模板以外的其它所有组分。优化了反应体系的 PCR 预混液可以得到更稳定的扩增结果。

Xerox DNA 聚合酶是一种高保真的热稳定 DNA 聚合酶, 用于快速高保真 PCR 扩增。在镁离子存在的条件下, 该酶可催化三磷酸脱氧核苷酸沿 5'→3' 方向发生聚合反应, 合成 DNA。它还具有校正功能的 3'→5' 外切酶活性。Xerox DNA 聚合酶扩增得到的产物为平末端, 可以直接克隆于平末端克隆载体或加 A 尾克隆于普通 T 载体中。Xerox DNA 聚合酶具有更高的保真性 (保真性是 Taq DNA 聚合酶的至少 50 倍, 为 Pfu DNA 聚合酶的 6 倍), 更快的 DNA 合成速度 (15-30sec/kb) 和更强的扩增能力。

保存条件: -20℃ 保存, 有效期一年。

产品用途:

- 高保真 PCR 快速扩增
- 复杂模板的 DNA 扩增
- 长距离 PCR
- 血液直接 PCR 扩增

PCR 扩增体系

实际操作中应该首先计算需补加水的体积, 先加水, 然后按下表中所列顺序添加其它成分。充分混匀后, 离心数秒使反应混合物沉到管底, 将反应管置于 PCR 仪中进行扩增。

Component	25 µl Reaction	50 µl Reaction	Final conc.
Nuclease-Free Water	Add to 25µl	Add to 50µl	
2× Xerox PCR Master Mix	12.5µl	25µl	1×
10 µM Forward Primer	0.5-1µl	1-2µl	0.2-0.4µM
10 µM Reverse Primer	0.5-1µl	1-2µl	0.2-0.4µM
Template DNA	variable	variable	< 1,000ng

扩增模板

1. 低复杂基因组模板 (质粒、病毒、λ 和 BAC DNA 等), 50 µl 体系中添加 5-10 ng。为获得更高保真性的扩增产物, 高浓度模板和少量 PCR 循环数组合是一个较好的方法。
2. 高复杂基因组模板, 50 µl 反应体系中, DNA 模板的使用量应该在 100-500 ng, 如果扩增的片段较长, 最好用琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性。DNA 的完整性越好, 长距离 PCR 的成功率越高。
3. cDNA 模板的添加量不要超过 PCR 反应体系的 1/10, 50 µl PCR 反应体系中 RT 产物的加入量为 2-3µl, 不要超过 5µl。

PCR 循环设置

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98℃	1min	1
Denaturation	98℃	5-10sec	25-40
Annealing	50-72℃	10-20sec	
Extension	72℃	10-30sec/kb	
Final extension	72℃	5 min	1
	4℃	Hold	

Xerox DNA 聚合酶具有的很高热稳定性, 可以用 98℃ 预变性, 对于大多数模板而言, 98℃ 预变性 1 min 就足够了, 预变性不要超出 3 min。当然也可以按照常规方法使用 94℃ 变性 2-5 min。血液直接扩增时, 预变性可设置 95℃ 10 min, 让细胞裂解并释放

DNA。

在循环扩增时，98℃变性持续时间可以设定 5-10sec，简单模板 5sec，复杂模板 10sec。

一般条件下，可以采用如上表所列的三温度梯度循环的 PCR 扩增方法，引物的退火温度为两条引物中较低 T_m-5，引物的退火持续时间可以设定 10-20 sec。当两条引物的 T_m 值都大于等于 70℃时，而且都使用了长引物，可以使用两步法来扩增，两步法中退火温度和延伸温度都为 72℃。

Xerox DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72℃。延伸所需要的时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒，BAC 这类简单模板，可以使用 15 sec/kb 延伸速度，对于高复杂性的基因组 DNA，可以使用 30sec/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时，延伸时间不要超过 40 sec。

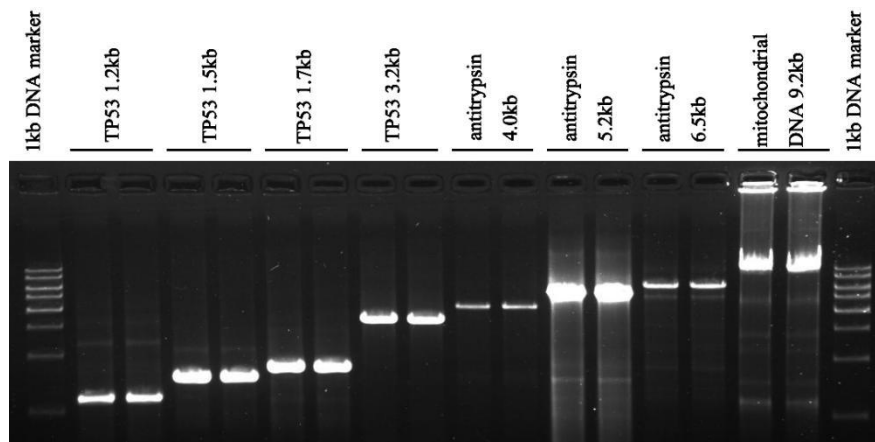
结果检测：

PCR 反应结束后，5-10μl 扩增产物用含 0.5μg/ml 溴化乙锭（或合适浓度的其它 DNA 染色试剂），合适浓度的琼脂糖凝胶电泳检测，电泳完成后在紫外透射仪下观察并记录结果。

实验例：

实验例一

以人基因组 DNA（HeLa）为模板，按照 30 sec/kb 的延伸速度，三步循环 PCR 法成功扩增出不同长度的 DNA 序列。



实验例二

50μl 体系中分别加入 1 至 10μl 的 EDTA 抗凝人全血直接做模板（血液终浓度为 2%-20%，最后一个泳道为 50ng 纯化的 DNA 对照）。95℃预变性 10min，98℃变性 10sec，60℃退火 20sec，72℃按 30sec/kb 的延伸速度，40 个循环，可以扩增出 1.2kb、1.7kb 和 3.2kb 长度的 TP53 DNA。如图所示聚合酶活性不受血液的影响，而扩增量随着血液量的增加而变大。

