



Lyo-easy® Super Pfx Master Mix

产品名称：Lyo-easy® Super Pfx Master Mix

目录号：CW3403S (80 rxns)
CW3403M (400 rxns)

保存条件：2-30 °C保存

运输方式与有效期：本品常温运输，有效期1年。

产品内容

Component	CW3403S 80 rxns	CW3403M 400rxns
Lyo-easy® Super Pfx Master Mix	80 rxns	5×80 rxns
1.5×Pfx ReSolve Buffer	1.5 mL	5×1.5 mL

产品简介

Lyo-easy® Super Pfx Master Mix为优化的半冻干预混试剂，以专用的1.5×Pfx ReSolve Buffer复溶，包含Super Pfx DNA Polymerase、Mg²⁺、dNTPs、冻干保护剂以及反应缓冲液等，只需要添加引物和DNA模板即可进行PCR实验。Super Pfx DNA Polymerase具有3'→5'外切酶活性，保真性约为Taq DNA聚合酶的100倍，是克隆的理想选择。该酶通过引入延伸增强技术，在维持高保真度的同时，实现了10 sec/kb的高速延伸，扩增长度可达20 kb。此外，本产品在兼具高成功率的同时，对于扩增反应困难的长片段、GC-rich区域和过量模板也可以进行扩增。扩增产物的3'端不带有“A”碱基，适用于平末端载体克隆。

本品包括冻干粉和专用复溶剂两个组分，使用前可在室温下运输和储存。

自备仪器

建议使用BioRad、Agilent、ABI和东胜等公司的PCR仪。

试剂和耗材

请自备RNase-Free Water和气密性良好的PCR管。

实验前准备及重要注意事项

1. 1.5×Pfx ReSolve Buffer使用前请上下颠倒混匀，并经短暂离心后使用。
2. 取下冻存管盖后，应在1h内使用专用的1.5×Pfx ReSolve Buffer进行复溶，复溶后如需长期保存可置于-20±5℃，如在短期内需要频繁使用可置于2-8℃保存，避免反复冻融。
3. 带有尿嘧啶的引物和模板不适用于本产品。

使用方法

1. 取下Lyo-easy® Super Pfx Master Mix的冻存管盖后，向每管中加入1400 μL 1.5×Pfx ReSolve Buffer，轻轻涡旋混匀，完全溶解后即为1.5×预混液。
2. PCR反应体系

如上所述进行复溶后，可直接进行扩增体系配制。已复溶的预混液，若于-20±5℃保存后再次使用，请于冰上完全解冻，上下颠倒混匀并经短暂离心后使用。

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据具体用途、模板、引物结构、目的片段大小和扩增效果不同进行相应的改进和优化。

组分	25μL 反应体系	终浓度
Lyo-easy® Super Pfx Master Mix	16.7 μL	1×
Forward Primer, 10 μM	1-1.25 μL	0.4-0.5 μM
Reverse Primer, 10 μM	1-1.25 μL	0.4-0.5 μM
Template DNA	可变量	基因组DNA~500 ng/50 μL 质粒或病毒~50 ng/50 μL cDNA (RNA相当量) ~750 ng/50 μL
ddH ₂ O	Up to 25 μL	

注意:

- 1) 组分添加完后请混合均匀并迅速转移到PCR仪里。
- 2) 引物终浓度推荐为0.4-0.5 μM，但扩增10 kb以上的长片段时，引物终浓度为0.3 μM可提高扩增产物量。

3. PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ¹⁾	98°C	30 sec	} 25-35个循环
变性	98°C	5-10 sec	
退火 ²⁾	根据引物T _m 定	10-30 sec	
延伸 ³⁾	72°C	20-30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	

注意:

- 1) 预变性: 对于多数纯化后的模板, 98°C 30 sec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T_m低3-5°C, 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T_m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, 延伸时间通常为20-30 sec/kb, 但对于简单模板(质粒、大肠杆菌等)或 < 1 kb的复杂模板, 延伸时间可缩短至10 sec/kb。如果需要, cDNA或 > 6 kb的复杂模板, 延伸时间可以增加至40-50 sec/kb。