

2×F3 FastLong PCR MasterMix

组成	编号	KM-P-0151	KM-P-0152
	2×F3 FastLong PCR MasterMix		1ml

❖ **产品储存:** -20 °C 保存 2 年。短时间 (1 个月内) 使用可以置 4 °C。

制品说明: 本产品包含 F3 FastLong DNA Polymerase、dNTPs 和优化的反应缓冲液, 浓度为 2×。使用时只需加入模板、引物, 并补足水至 Mix 终浓度为 1×即可。本产品含红色示踪染料, 不需添加上样缓冲液即可直接上样进行电泳; 也可经过纯化处理, 以用于酶切、连接、荧光测序等后续操作。

❖ **产品特点:**

扩增速度快: 延伸速度可以达到 5-10 秒/kb, 最短半小时完成 PCR。

2. 突出的长片段扩增能力: 可以扩增高达 10kb 的长片段 (包括人类基因组此类的复杂模板)。

3. 良好保真性: 保真度是 *taq* 的 3 倍以上。

4. 强大扩增能力: 产量高, 对于一些有特殊结构的复杂模板和 GC 含量高模板有良好效果。

❖ **建议 PCR 体系设置:**

Component	25 µl Reaction	50 µl Reaction	Final Concentration
2×F3 PCR MasterMix	12.5 µl	25 µl	1 ×
Forward Primer(10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
Reverse Primer(10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
Template DNA	as required	as required	
ddH ₂ O	up to 25 µl	up to 50 µl	

参考模板用量 (50µl 反应体系):

质粒: 0.1-10ng; 细菌基因组: 10-100ng; 人类基因组: 50-150ng; cDNA: 1-5µl from RT reaction。

❖ **建议 PCR 循环条件:**

Step	Temperature	Time	Cycle Number
Initial denaturation	94 °C	2-3 minutes	
Denaturation	94 °C	10 seconds	25-35 cycles
Annealing	55 °C	10-15 seconds	
Extension	72 °C	10 seconds / kb	
Final Extension	72 °C	1-5 minutes	
	4-8 °C	Hold	

❖ **注意事项:**

1. F3 扩增速度极快，质粒和简单基因组等简单模板可以采用 5 秒/kb 延伸速度并采用较少循环数以进一步缩短 PCR 时间。复杂模板和长片段 ($\geq 3\text{kb}$) 如人类基因组可以采用 15-20 秒/kb 延伸速度或采用较多循环数。
2. F3 产量较低时可尝试采用较长的延伸时间 (如 20 秒/kb) 和循环数 (如 35 个) 可以提高 PCR 产物产量。
3. 对于 GC 含量很高的模板，短片段预变性和变性温度可以提高到 98 °C 或/和适当延长变性时间。长片段为了避免 DNA 损伤不应该提高变性温度，应该适当延长预变性时间到 5 分钟，变性时间可以适当提高 5-10 秒。
4. 如果扩增模板 GC 含量高或者模板复杂扩增效果不佳时，可在反应混合物中加入 DMSO 到终浓度 1%-8%，按照 1% 梯度增加摸索最佳浓度。或者加入甜菜碱至终浓度 1.0-1.7 M。并采用降落 PCR (Touchdown PCR)。

每一批 2 ×F3 PCR Mix 出货前必须通过下面的 2 种大小片段的扩增检测

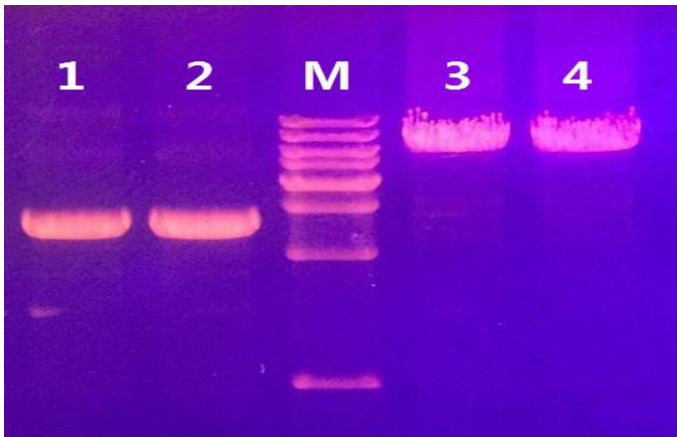


Figure.1. Amplification of DNA fragment from 50 ng human genomic DNA in 50 μl reaction mixture. Lane M: 1kb ladder; Lane 1-2: H α 1AT, 2.6Kb, extension 10 sec/kb; Lane3-4: β -globin, 6kb, extension 15 sec/kb.