

# 2 × Vazyme LAmp® Master Mix

P311/P312

Version 9.2



Vazyme biotech co., Ltd.

## 产品概述

Vazyme LAmp DNA Polymerase是Taq DNA Polymerase与一种含有3'→5'外切酶活性(校对活性)的蛋白组成的混合酶,保真度是Taq DNA Polymerase的6倍。配合特别优化的缓冲体系,Vazyme LAmp DNA Polymerase非常适合长片段的扩增,可从基因组中扩增长达21 kb的片段,并且对不同来源、不同长度的模板均具有很高的扩增效率。本产品包含Vazyme LAmp DNA Polymerase, dNTP以及优化的缓冲体系,只需加入引物和模板即可进行扩增,减少了移液操作,提高了检测通量和结果的重现性。体系中加入的保护剂使得2 × Master Mix经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。本品还提供含有电泳缓冲液和染料的版本,可在反应结束后直接进行电泳,使用方便。PCR产物的3'末端带A,可直接克隆至T载体,并适用于ClonExpress®和拓扑克隆试剂盒(C112/C113/C115/C601)。

## 产品组分

组 分	P311-01	P311-02	P311-03
2 × Vazyme LAmp Master Mix	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

组 分	P312-01	P312-02	P312-03
2 × Vazyme LAmp Master Mix (Dye Plus)	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

## 保存条件

-30 ~ -15°C保存。运输条件: ≤0°C。

## 质量控制

核酸内切酶残留检测: 20 μl本品和0.3 μg Supercoiled pBR322 DNA在37°C下孵育4 h, DNA的电泳谱带不发生变化。

功能检测: 50 μl PCR体系中加入25 μl本品, 分别以10 ng人基因组DNA、10 ng棉花基因组DNA、1 ng λDNA、50 ng HeLa细胞总RNA对应的cDNA、10 ng大豆基因组DNA、10 ng水稻基因组DNA为模板, 扩增不同长度和GC含量的8个片段, 延伸时间设置为30 sec/kb。35个循环后将1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 可见有单一的相应条带。

## 实验流程

### 反应体系

ddH <sub>2</sub> O	To 50 μl
2 × Vazyme LAmp Master Mix	25 μl
Primer1 (10 μM)	2 μl
Primer2 (10 μM)	2 μl
Template DNA*	x μl

\* 不同模板最佳反应浓度不同, 下表为50 μl反应体系推荐模板使用量:

动植物基因组DNA	0.1 - 1 μg
大肠杆菌基因组DNA	10 - 100 ng
cDNA	1 - 5 μl (不超过PCR反应总体积的1/10)
质粒DNA	0.1 - 10 ng
λDNA	0.5 - 10 ng

## 反应程序

目的片段 < 5 kb

94°C	5 min (预变性)	}	30 - 35 cycles
94°C	30 sec		
55°C*	30 sec		
72°C	30 sec/kb		
72°C	7 min (彻底延伸)		

\* 温度需要根据引物的Tm值进行调整，一般设置成低于引物Tm值3 ~ 5°C即可；对于复杂模板，需要调节退火温度和延长延伸时间来实现高效扩增。

目的片段 > 5 kb

94°C	1 - 3 min (预变性)	}	30 - 35 cycles
94°C	10 sec		
68°C*	30 - 60 sec/kb		
68°C	7 min (彻底延伸)		

\* 对于 > 5 kb 的片段，推荐使用长引物，Tm值在68 ~ 70°C，把退火/延伸温度合并为68°C。这样可以显著提高扩增特异性。延长延伸时间有助于提高扩增产量。

## 注意事项

### 引物设计

1. 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C；
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
3. 引物3'端应避免出现发夹结构；
4. 正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1°C为佳，Tm值调整至55 ~ 65°C为佳(引物Tm值推荐使用Primer Premier 5进行计算)；
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算；
6. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间；
7. 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；
8. 避开引物内部或者两条引物之间有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；
9. 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。

## 常见问题及解决方案

	无产物或产物量少	有杂带或弥散条带
引物	优化引物设计	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	尝试提高退火温度，可间隔2°C设置温度至65°C
引物浓度	适当提高引物浓度	降低引物浓度至终浓度为0.2 μM
延伸时间	适当增加延伸时间	有大于目标条带的杂带时可减少延伸时间
循环数	增加循环数至35 - 40个循环	减少循环数至25 - 30个循环
模板纯度	使用高纯度模板	使用高纯度模板
模板使用量	粗提样品可能需要减少使用量；其他样品使用量参照反应体系推荐量并适量增加	使用量参照反应体系推荐量调整



ISO 9001: 2015