

Super HIFI DNA Polymerase

货号规格

货号	P1251	P1252
规格	100U	500U

产品简介

Super HIFI DNA Polymerase 为高保真 DNA 聚合酶。其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 50 倍左右, 适合克隆和其他需要高保真度的应用。与其他 DNA 聚合酶相比, Super HIFI DNA Polymerase 性能稳健, 实验方案耗时短, 耐受 PCR 抑制剂, 且能够以较少的酶量获得较高得率。扩增片段的长度可达 7.5 kb 基因组和 20 kb λ DNA。该酶具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性, 扩增产物具有平末端。

产品组成

Component	P1251	P1252
Super HIFI DNA Polymerase (2U/μl)	50 μl	250 μl
5X Super HF Buffer ^[1]	1.5 ml × 2	1.5 ml × 6
5X Super GC Buffer ^[1]	1.5 ml	1.5 ml × 2
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 ml	1.5 ml × 2
DMSO	500 μl	500 μl

[1] 5X Super HF Buffer 和 5X Super GC Buffer 均提供终浓度为 1.5 mM 的 MgCl₂。

活性定义

一个活性单位 (U) 指用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 72°C、30 min 内, 摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

保存条件

-20°C 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

请于冰上配置反应体系, 注意最后添加 Super HIFI DNA Polymerase:

Ordinal	Component	20-μl rxn	50-μl rxn	Final conc.
1	超纯水 ^[1]	To 20 μl	To 50 μl	-
2	5X Super HF Buffer ^[2]	4 μl	10 μl	1X
3	dNTPs (10mM)	0.4 μl	1 μl	0.2 mM
4	upstream primer (10 μM) ^[3]	1 μl	2.5 μl	0.5 μM
5	downstream primer (10 μM) ^[3]	1 μl	2.5 μl	0.5 μM
6	template DNA ^[4]	X μl	X μl	-
7 (可选)	DMSO ^[5]	0.6 μl	1.5 μl	3%
8	Super HIFI DNA Polymerase (2U/μl)	0.2	0.5 μl	0.02 U/μl

[1] 可单独订购超纯水 (#P9021/P9022/P9023)。

[2] 建议使用 5X Super HF Buffer, 当扩增复杂模板和长片段时推荐使用 5X Super GC Buffer。

[3] 引物终浓度建议范围: 0.2-1 μM。

[4] 不同模板最佳用量不同, 部分 DNA 模板建议用量如下表 (50 μl 反应体系)。

Template	人类基因组 DNA	λDNA	大肠杆菌基因组 DNA	质粒 DNA
Dosage	0.1μg-1μg	0.5ng-5ng	10ng-100ng	0.1ng-10ng

[5] 当扩增子 GC 含量高时推荐使用 DMSO。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

2-step protocol:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	98°C	30 sec	1
Denaturation	98°C	5-10 sec	25-35

Annealing & Extension	72°C	15-30 sec/kb	
Final Extension	72°C	5-10 min	1
Hold	4°C	hold	hold

3-step protocol:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	98°C	30 sec	1
Denaturation	98°C	5-10 sec	25-35
Annealing	55-68°C	10-30 sec	
Extension	72°C	15-30 sec/kb	
Final Extension	72°C	5-10 min	1
Hold	4°C	hold	hold

3. 分析结果

将产物与 *loading buffer* 混匀后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* (#P9041)、*MgCl₂* (#P9031) 等可提高产量。

操作注意事项

1 室温下 *Super HIFI DNA Polymerase* 有一定的活性, 为避免降解引物, 请于冰上配置反应体系, 并且最后添加 *Super HIFI DNA Polymerase*。

2 *Super HIFI DNA Polymerase* 的扩增产物只有平末端, 可直接用于平末端连接。如要进行 TA 克隆, 请先进行加 A 反应, 以提高克隆效率。(加 A 反应: 参考如下体系, 72°C, 15-30min)

PCR (纯化) 产物	1-7 μ l
10 \times Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	1 μ l
dATP	0.2 mM
Taq DNA 聚合酶	5U
超纯水	To 10 μ l

3 碱基出错率是指在每个碱基合成过程中所掺入的错误核苷酸数目。 *Super HIFI DNA Polymerase* 的碱基错误率为 4.4×10^{-7} 。

4 dUTP、dITP 和含有这些核苷酸的引物不能用于 *Super HIFI DNA Polymerase* 催化的 PCR 扩增。因为该酶与含有尿嘧啶和次黄嘌呤的 DNA 模板结合后会中止 DNA 聚合反应。

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; *T_m* 值控制在 55-65°C 之间, 且上下游引物 *T_m* 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 *T_m* 值计算。

本品仅供科学研究使用。