

Super HIFI PCR Master Mix

货号: P2111, P2112, P2113

产品简介

Super HIFI PCR Master Mix 是含热启动校正 DNA 聚合酶的 PCR 预混液, 包含 PCR 反应所需的各种组分 (引物和模板除外)。其中双抗体修饰的超高保真 DNA 聚合酶特异性极高, 保真性能是 Taq 的 100 倍。可用于分子克隆、一代测序和定点突变、NGS 建库等需要高度精确性的 PCR。本扩增试剂经过了严格的质量控制和功能验证, 最大程度上保证了试剂的稳定性和重复性。本产品适用于 DNA 模板起始量为 1 - 100 ng 的模板的多重扩增、扩增子建库反应, 兼容不同样品类型来源的 DNA 模板: 细胞或组织 DNA、福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本 DNA、细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 等。

产品组成

Component	P2111 (100 rxns)	P2112 (1000 rxns)	P2113 (5000 rxns)
2X Super HIFI PCR Master Mix	1 ml × 1	1 ml × 10	10 ml × 5
GC Enhancer	0.25 ml × 1	1 ml × 2	10 ml × 1

保存条件

-20℃ 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

注意: 实验开始前, 先准备各引物浓度均为 0.5μM 的引物混合物 Primer Mix。

1. 配制 PCR 反应体系

1.1 于冰上完全融化所有试剂, 反复颠倒混匀, 短暂离心后置于冰上备用。

1.2 使用 96 孔光学反应板, 将下列物质加入每个反应孔中:

Component	Amount (20 μl reaction volume)	Final concentration (20 μl reaction volume)
2X Super HIFI PCR Master Mix	10 μl	1X
Primer Mix (0.5μM each)	2 μl	50nM each primer ^[1]
template DNA	40~80ng	2~4ng/μl
GC Enhancer	0/2.4 μl ^[2]	0/12%
超纯水	To 20 μl	-

[1] 引物终浓度的建议范围: 0.05-0.4μM。对于大多数反应来说, 0.15μM 的引物可以得到理想的结果。提高引物浓度至 0.4μM 可以增加产物的量。

[2] 仅当高 GC 含量的靶标序列无法被高效扩增时需要使用 GC Enhancer。

1.3 用透明胶膜密封反应板。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

2.1 按照仪器的用户手册设置运行方法。参考以下参数:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95℃	3 min	1
Denaturation	95℃	30 sec	25-35
Annealing	55-68℃ ^[1]	90 sec	
Extension	72℃	Variable ^[2]	
Final Extension	72℃	5-10 min	1

[1] 退火温度应根据 T_m 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 2 kb/min 来设最佳。

2.2 混匀反应板中的反应液, 并短暂离心。

2.3 将反应板放入仪器中, 并开始运行。请参阅所用仪器的用户手册, 了解如何使用的详细说明。

3. 分析结果

反应产物可直接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* (Cat. #: P9041)、 $MgCl_2$ (Cat. #: P9031) 等可提高产量。

操作注意事项

1 室温下热启动 DNA 聚合酶活性被抑制，不易发生非特异性扩增，反应体系可于冰上配制。

2 *Super HIFI PCR Master Mix* 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℃，15-30min）

PCR（纯化）产物	1-7 μ l
10× <i>Taq Buffer</i> (Mg^{2+} Plus)	1 μ l
dATP	0.2 mM
<i>Taq DNA</i> 聚合酶	5U
超纯水	To 10 μ l

3 dUTP、dITP 和含有这些核苷酸的引物不能用于 *Super HIFI PCR Master Mix* 催化的 PCR 扩增。因为校正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℃ 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。