

快速高保真酶简明说明书 (BW-EHF1101)

产品简介

为确保使用 Express High Fidelity DNA Polymerase 成功 PCR，提供了以下操作指南。该指南覆盖了常规 PCR。高 GC 含量、高二级结构、低浓度、长扩增子的模板的扩增条件可能需要进一步优化。

产品构成

Catalog#	-00/10	-01/11	-02/12	-03/13
EHF DNA Polymerase	50 U (10 µL)	250 U (50 µL)	500 U (100 µL)	6×500 U (600 µL)
5× Express Hi Fi PCR Buffer (with Mg ²⁺)	400 µL	2000 µL	4×1000 µL	24×1000 µL
10 mM dNTPs	-/40 µL	-/200 µL	-/400 µL	-/2400 µL
Nuclease-free water	2 mL	8 mL	16 mL	96 mL
DMSO	70 µL	350 µL	700 µL	4200 µL
User Manual	1	1	1	1

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。除 DMSO（室温储存）外，所有试剂保存于 -20°C。

操作步骤

1. **反应设置：**所有反应组分于冰上进行，并迅速将反应液转移至 98°C 预热的 PCR 仪上。所有的试剂使用前都需充分混匀并瞬

时离心。为了防止 Express Hi Fi DNA Polymerase 的 3'→5' 核酸外切酶活性对引物的降解，Express Hi Fi DNA Polymerase 必须最后加入到反应体系中。为了减少移液误差，Express Hi Fi DNA Polymerase 可以在使用前用 1× Express Hi Fi Buffer 稀释。请注意，Express Hi Fi DNA Polymerase 的操作步骤可能与其他标准聚合酶不同，因此，应该使用下表推荐的条件来获得最佳性能。

Components	20 µL Rxn	50 µL Rxn	Final Concentration
Nuclease-free water	to 20 µL	to 50 µL	
5× Express Hi Fi PCR Buffer (with Mg ²⁺)	4 µL	10 µL	1×
10 mM dNTPs	0.4 µL	1 µL	200 µM
Forward Primer (10 µM)	1 µL	2.5 µL	0.5 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µL	2.5 µL	0.5 µM
Template DNA	variable	variable	< 250 ng
DMSO (optional)	0.6 µL	1.5 µL	3%
Express Hi Fi DNA Polymerase	0.2 µL	0.5 µL	2.5 U/50 µL PCR

注：用移液器吹吸混匀反应体系。瞬时离心将所有的液体收集到管底。

2. 将 PCR 管从冰上转移至预热（变性温度 98°C）的 PCR 仪并开始热循环。

常规 PCR 体系如下：

步骤	温度	时间
预变性	98°C	30 s

30-35 个循环	98°C	5-10 s
	45-72°C	10-30 s
	72°C	10-15 s/kb
终延伸	72°C	5-10 min
保存	4-10°C	可长时间保存

3. 常规步骤：

模板：

使用高质量、高纯度的 DNA 模板可以极大地提高 PCR 的成功率，50 µL 反应体系建议的 DNA 模板用量如下：

DNA	用量
基因组	50 ng-250 ng
质粒或病毒	1 pg-20 ng

4. 若模板 DNA 来自 cDNA 合成反应体系，则加入的体积应小于总反应体积的 10%。

5. 引物：

寡核苷酸引物（Oligo 引物）的长度一般为 20-40 个核苷酸，理想的 GC 含量为 40-60%。可以用软件（如 Primer 3）设计或分析引物。使用 Express Hi Fi DNA 聚合酶反应时，每种引物的最终浓度可能为 0.2-1 µM，但我们建议使用 0.5 µM。

6. Mg²⁺

Mg²⁺对 Express Hi Fi DNA 聚合酶达到最佳活性具有重要的作用，1× Express Hi Fi Buffer 和 GC Buffer 中，最终 Mg²⁺的浓度为 1.5

mM。过量的 Mg^{2+} 可能会阻止 DNA 的完全变性，也会引起引物的非特异性结合。最佳的 Mg^{2+} 浓度受 dNTP 浓度、模板使用量和加入反应体系中的添加剂影响，同时螯合剂（如 EDTA）也可能产生影响。使用提供的 $MgCl_2$ ， Mg^{2+} 可以 0.5 mM 的增量进行优化。

像富含 GC 序列或二级结构的这些复杂的靶标扩增，可以通过现有的添加剂，如 DMSO 进行改进。推荐终浓度为 3% 的 DMSO，可通过以 2% 的增量优化浓度。值得注意的是，如果使用高浓度的 DMSO，必须降低退火温度，因为它会降低引物的 T_m 。同时 Express Hi Fi DNA 聚合酶也可与其他添加剂（甲酰胺或甘油）相溶。

7. dNTPs:

dNTP 的最终浓度通常是各个脱氧核苷酸 200 μ M。

8. Express Hi Fi DNA Polymerase 浓度:

通常推荐 Express Hi Fi DNA Polymerase 的使用浓度为 50 U/mL (2.5 U/50 μ L 体系)。但是，根据扩增子的长度和难度，Express Hi Fi DNA Polymerase 的最佳浓度可能在 10-50 U/mL (0.5-2.5 U/50 μ L 体系) 变化。不要超过 2.5 U/50 μ L，尤其对于长度超过 5 kb 的扩增子。

9. Buffers:

5 \times Express Hi Fi PCR Buffer (with Mg^{2+}) 与酶一起提供，Express Hi Fi Buffer 是推荐的高保真扩增的缓冲液。

10. 预变性:

设定预变性条件：98 $^{\circ}$ C 变性 30 s。这对来自纯 DNA 模板的大多

数扩增子是有效的，而对于有要求的模板可使用更长的变性时间（最多 3 min）。在热循环中，变性步骤应保持在最低限度，通常，对于大多数模板来说，建议 98 $^{\circ}$ C，变性 5-10 s。

11. 退火:

Express Hi Fi DNA Polymerase 所需要的退火温度一般高于其他 PCR 聚合酶。通常，长度大于 20 个核苷酸的引物，高于引物对中较低的 T_m 引物 3 $^{\circ}$ C，退火 10-30 s；如果长度小于 20 个核苷酸，则应设置与较低引物的 T_m 相同的退火温度。温度梯度也可用于优化每个引物对的退火温度。对于两步法扩增，温度梯度的设置可以与延伸温度一样高。

对于高 T_m 引物对，可以使用没有退火步骤的两步法。

12. 延伸:

推荐的延伸温度为 72 $^{\circ}$ C，延伸时间取决于扩增子的长度和复杂性。通常情况下，可设定延伸时间为 15 s/kb。而对于复杂的扩增子，如基因组 DNA，则推荐设定延伸时间为 30 s/kb；对于 cDNA 模板，如有必要，也可以将延伸时间增加到 40 s/kb。

13. 循环数:

通常情况下，30-35 个循环即可产生高效的 PCR 产物。

14. 两步法 PCR:

当使用的引物退火温度 $\geq 72^{\circ}$ C 时，建议使用以下两步法 PCR:

步骤	温度	时间
预变性	98 $^{\circ}$ C	30 s
30-35 个循环	98 $^{\circ}$ C	5-10 s

	72 $^{\circ}$ C	15-30 s/kb
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5-10 min
保存	4 $^{\circ}$ C	

15. PCR 产物

使用 Express Hi Fi DNA 聚合酶扩增的产物具有平末端。若接下来需要进行克隆，则推荐用平末端克隆；但若接下来需进行 TA 克隆，DNA 在加 A 之前需要纯化，因为 Express Hi Fi DNA 聚合酶会降解产生的所有突出端。

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com