

快速高保真酶预混液简明说明书 (BW-EHF1102)

产品简介

Express High Fidelity DNA Polymerase PCR Mix 是由 Express Hi Fi DNA Polymerase, 脱氧核苷酸和反应缓冲液组成的 2×混合液, 该混合液已经过优化并包含 MgCl₂。反应时还需要加入模板, 引物和水。

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 | -01 | -02 |
|---|--------|--------|----------|
| 2× Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix | 100 μL | 1.0 mL | 5×1.0 mL |
| Nuclease-free water | 100 μL | 1.0 mL | 5×1.0 mL |
| User Manual | 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。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。为了防止由 3'→5' 核酸外切酶活性对引物的降解, 2× Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix 必须最后加入到反应

体系中。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, 应该使用以下推荐的条件来获得最佳性能。

| Components | 25 μL Rxn | 50 μL Rxn | Final Concentration |
|---|-----------|-----------|---------------------|
| Forward Primer (10 μM) | 1 μL | 1 μL | 0.5 μM |
| Reverse Primer (10 μM) | 1 μL | 1 μL | 0.5 μM |
| DMSO (optional) | 0.75 μL | 1.5 μL | 3% |
| 2× Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix | 12.5 μL | 25 μL | 1× |
| Template DNA | variable | variable | < 250 ng |
| Nuclease-free water | to 25 μL | to 50 μL | |

注: 轻轻混匀反应体系。瞬时离心将所有的液体收集到管底。若没有 PCR 仪, 用矿物油覆盖样品。

将 PCR 管从冰中转移至 PCR 仪, 预热至 98°C 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 s/kb |
| 终延伸 | 72°C | 5-10 min |
| 保存 | 4-10°C | 可长时间保存 |

2. 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 |

3. 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%。

4. 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%。

5. Mg²⁺, 脱氧核苷酸和添加剂

在 1× 浓度时, Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix 提供了 1.5 mM MgCl₂ 和 200 μM 的 dNTP (终浓度)。Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix 不能结合 dUTP, 不建议与含尿嘧啶的引物或模板一起使用。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 Polymerase PCR Mix 也可与其他添加剂 (甲酰胺或甘油) 相溶。

6. Express Hi Fi DNA Polymerase 浓度:

Express Hi Fi DNA Polymerase 的浓度已经优化, 在广泛条件下可获得最佳结果。根据建议建立的体系中酶的浓度在 2.5 U/50 μL

或 1 U/20 μ L。

7. 预变性:

设定预变性条件: 98°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°C, 变性 5-10 s。

8. 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°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。

9. 延伸:

推荐的延伸温度为 72°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 10-20 s/kb; 对于 cDNA 模板, 如有必要, 也可以将延伸时间增加到 30 s/kb。

10. 循环数:

通常情况下, 30-35 个循环即可产生高效的 PCR 产物。

11. PCR 产物

使用 2 \times Express Hi Fi DNA Polymerase PCR Mix 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