****

**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 Mg2+) | 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℃。

**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℃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 μLRxn** | **Final Concentration** |
| Nuclease-free water | to 20 μL | to 50 μL |  |
| 5× Express Hi Fi PCR Buffer (with Mg2+) | 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。

1. 将PCR管从冰上转移至预热（变性温度98℃）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℃ | 30 s |
| 30-35个循环 | 98℃  45-72℃  72℃ | 5-10 s  10-30 s  10-15 s/kb |
| 终延伸 | 72℃ | 5-10 min |
| 保存 | 4-10℃ | 可长时间保存 |

1. **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 |

1. 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%。
2. **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。

1. **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Mg2+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Mg2+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）也可能会产生影响。使用提供的MgCl2，Mg2+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Tm。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。

1. **dNTPs**：

dNTP的最终浓度通常是各个脱氧核苷酸200 μM。

1. **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 μL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 μL体系)变化。不要超过2.5 U/50 µL，尤其对于长度超过5 kb的扩增子。

1. **Buffers**：

5× Express Hi Fi PCR Buffer（with Mg2+）与酶一起提供，Express Hi Fi Buffer是推荐的高保真扩增的缓冲液。

1. **预变性**：

设定预变性条件：98℃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℃，变性5-10 s。

1. **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Tm引物3℃，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Tm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Tm引物对，可以使用没有退火步骤的两步法。

1. **延伸**：

推荐的延伸温度为72℃，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。

1. **循环数**：

通常情况下，30-35个循环即可产生高效的PCR产物。

1. **两步法PCR**：

当使用的引物退火温度≥72℃时，建议使用以下两步法PCR：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **步骤** | **温度** | **时间** |
| 预变性 | 98℃ | 30 s |
| 30-35个循环 | 98℃  72℃ | 5-10 s  15-30 s/kb |
| 终延伸 | 72℃ | 5-10 min |
| 保存 | 4℃ |  |

1. **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**

**BIOMIGA（中国）**

**[www.biomiga.com.cn](http://www.biomiga.com.cn)**

**400-115-2855**

**[info@biomiga.com.cn](mailto:Info@biomiga.com.cn)**