



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动



Order: 010-59822688  
 Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057  
 TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: KP190805

浓缩国际权威精华，  
 铸就TIANGEN优秀品质！

## Ultra HiFidelity PCR Kit 超强高保真PCR试剂盒

目录号: KP203

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品

### 产品内容

产品组成	KP203-01	KP203-02	KP203-03
2×UltraHiFi Mix (with dye)	1 ml	5×1 ml	5×5×1 ml
PCR Enhancer	500 μl	500 μl	5×500 μl
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	5 ml	5×5 ml

### 保存条件

请将试剂盒置于-25~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

---

## 产品简介

Ultra HiFidelity PCR Kit是一种新型高保真PCR扩增预混液，适用于PCR相关的克隆和检测。

扩增预混液中的Ultra HiFi DNA Polymerase是通过定向分子进化技术开发得到的新型快速高保真DNA聚合酶，增强了DNA聚合酶对模板的亲合力，使得此酶在扩增速度和延伸能力上得到了提升，增加了PCR成功率和产物量。同时，此酶具有优良的3' - 5' 外切酶活性（Proofreading活性），保真性可达市场上主流产品水平，保证了基因和文库扩增过程中的真实性。此外，本产品中的DNA聚合酶具有热启动（Hot Start）功能，可有效的控制低温情况下的非特异扩增和酶活损耗，进而保证了PCR扩增的特异性和稳定性。

本产品为一管式预混Mix形式，内含热启动型的Ultra HiFi DNA Polymerase、超纯dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液等PCR反应所需组分，只需加入模板和引物即可进行PCR扩增反应，操作简便。除此之外，本产品中还整合了PCR Enhancer组分，可以提高Ultra HiFidelity PCR Kit对PCR反应抑制剂的耐受能力和对不同GC含量模板的适应能力，因此可以在扩增高级结构复杂的产物和PCR抑制剂含量较高的PCR体系时添加使用。

本产品的PCR产物为平末端，可加A处理再与T载体连接或直接使用平末端克隆载体进行基因克隆，如TIANGEN零背景快速连接试剂盒（目录号：VT205）。

## 产品特点

**高保真性：**为Taq聚合酶的50倍。

**超高特异性：**真正具有热启动性，特异性强。

**扩增快速：**延伸速度可达10-15 sec/kb。

**延伸力强：**可扩增长至20 kb的DNA片段。

**高灵敏度：**模板用量可低至1 pg。

**低偏好性：**对不同类型DNA片段具有均衡的扩增效率。

## 适用范围

用于DNA的高保真快速扩增，如基因表达克隆、基因定点突变、基因组点突变的分析（SNP）等。

## 常见问题

出现问题	可能原因	解决办法
无扩增产物或扩增产物很少	循环条件不合适	将延伸时间延长至15-30 sec/ kb
		增加2-5个循环
		使用 Step down PCR (针对 8 kb 以上扩增片段效果明显)
	模板 DNA 在质量或数量上不满足要求	增加模板加入量
		减少模板加入量 (降低过量模板的抑制作用或者降低不纯净模板中 PCR 抑制物的干扰)
		尽量用经过纯化的模板
		模板中RNA要去除干净
	引物问题	引物浓度不适合, 当扩增片段较长时尽量选择相对较低的引物浓度 (0.2-0.3 $\mu\text{M}$ ); 当模板浓度较低时, 尽量选择相对较高的引物浓度 (0.3-0.5 $\mu\text{M}$ )
		尽量使用新配制的引物
		引物设计不合理, 重新优化引物
出现杂带或弥散	循环条件不合适	提升退火温度或尝试两步法
		使用 Step down PCR
		减少2-5个循环
	引物降解或设计不合理	重新配制或设计引物 (适当的增加引物长度可提高引物和模板间的特异性)
	模板过量	按照说明书中推荐模板用量添加

## 一、PCR反应液的配制:

1. 将2×UltraHiFi Mix (with dye)、引物、模板和ddH<sub>2</sub>O于室温条件下 (15-25°C) 融化, 混匀, 简短离心后于冰盒上备用。

2. 按照下表体系进行PCR反应体系的配制:

组分	50 $\mu\text{l}$ 反应体系加入量	反应浓度
DNA Template	Variable **	-
Primer F* (10 $\mu\text{M}$ )	1.25 $\mu\text{l}$	0.25 $\mu\text{M}$
Primer R* (10 $\mu\text{M}$ )	1.25 $\mu\text{l}$	0.25 $\mu\text{M}$
2×UltraHiFi Mix (with dye)	25 $\mu\text{l}$	1×
PCR Enhancer*** (if needed)	10 $\mu\text{l}$	1×
ddH <sub>2</sub> O	To 50 $\mu\text{l}$	-

注: 配制反应体系时, 请全程将反应管置于冰上进行操作。对于多个样品, 请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%, 以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。

\*引物终浓度为0.25  $\mu\text{M}$ 时可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 适当减少PCR反应体系中的引物浓度则可以增加PCR反应特异性。如有必要, 可以在0.2-1.0  $\mu\text{M}$ 间进行优化选择。

\*\*模板DNA用量请参照如下 (50  $\mu\text{l}$  PCR反应体系):

模板类型	模板用量范围	推荐模板用量
基因组DNA	1-1000 ng	100-500 ng
质粒DNA	0.01-100 ng	1-10 ng
cDNA	1-200 ng	50-100 ng
$\lambda$ DNA	0.01-100 ng	1-10 ng

\*\*\* PCR Enhancer可以提高Ultra HiFidelity PCR Kit对PCR反应抑制剂的耐受能力和对不同GC含量模板的适应能力。针对于复杂高级结构模板、高GC模板和抑制剂含量较高的模板进行PCR扩增, 当扩增效果不佳时, 可在PCR体系中添加PCR Enhancer。

3. 按步骤2中建议模板及引物用量加入模板、引物和ddH<sub>2</sub>O, 混匀后上机进行PCR反应。

## 二、PCR反应条件:

1. 使用2×UltraHiFi Mix (with dye) 进行扩增反应时, 请先使用三步法。

注: 进行三步法扩增时, 按延伸速度按照10-15 sec/kb进行设定; 对于DNA长度≥10 kb的模板或复杂模板, 可将延伸时间延长至30 sec/kb。下述反应程序仅供参考, 实际情况下, 客户可按照自身情况进行更改和调整。

三步法反应程序参考如下:

步骤	温度	时间	循环数
1	94°C	2 min	1
2	98°C	10 sec	35
3	60°C*	30 sec	
4	68°C	10-15 sec/kb	
5	68°C	5 min	1
6	4°C	Hold	1

\*退火温度为60°C可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。PCR反应特异性不高时, 可以在55-68°C范围内适当增加退火温度; 如果引物Tm值小于63°C, 可以将退火温度按Tm值进行设定。

2. 当扩增产物出现杂带或弥散时, 请尝试两步法或降落PCR (Step down PCR)。

两步法反应程序参考如下:

步骤	温度	时间	循环数
1	94°C	2 min	1
2	98°C	10 sec	35
3	68°C	10-15 sec/kb	
4	68°C	5 min	1
5	4°C	Hold	1

3. 结果检测: 反应结束后取5 μl反应产物, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

注: 2×UltraHiFi Mix (with dye) 中已添加电泳指示剂, 无需额外添加Loading Buffer。

## 三、扩增模板类型及长片段扩增举例:

1. 有记录的样品适用范围和扩增长度如下表所示:

模板类型	有记录的长片段扩增
人基因组DNA	-8 kb
大鼠基因组DNA	-8 kb
水稻基因组DNA	-8 kb
麦基因组DNA	-8 kb
玉米基因组DNA	-8 kb
大肠杆菌基因组DNA	-8 kb
cDNA	-6 kb
λ DNA	-15 kb

2. 具体扩增效果举例:

