

## Fast HiFidelity PCR Kit Fast HiFidelity PCR 试剂盒

目录号: KP202

储存条件: -20℃可保存1年

浓度: 2.5 U/μl

产品内容:

产品组成	KP202-01 (50 μl×50 rxn)	KP202-02 (50 μl×200 rxn)
Fast HiFidelity Polymerase	125 U	500 U
5×Fast HiFidelity PCR Buffer*	500 μl	2×1 ml
20×Fast PCR Enhancer	500 μl	500 μl
5×DNA Loading Buffer	500 μl	2×1 ml

\*内含dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, 稳定剂、增强剂和配体A/B等。

Order: 010-59822688

Toll-free: 800-990-6057/400-810-6057

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

### 产品简介

Fast HiFidelity Polymerase是从嗜嗜热原始菌 *Pyrococcus spp*中分离纯化的, 具有超强的3'-5'外切酶活性 (Proofreading活性), 保真性约为Taq DNA Polymerase的80倍。本产品采用了创新的合成亲和性配体技术, 配体以一种温度依赖性的方式来抑制聚合酶和外切酶的活性, 配体A在常温下能够抑制DNA Polymerase活性, 从而有效减少非特异性扩增; 配体B能够抑制3'-5'外切酶活性, 可防止引物和模板DNA的降解, 无需额外的激活步骤即可进行高特异性的Hot Start PCR。

本产品通过添加独有的延伸增强因子, 使延伸速度和扩增产量得到了显著提高。反应Buffer系统包含dNTPs, 增强剂, 稳定剂, 拥有特殊的Mg<sup>2+</sup>自动调节系统, 在整个反应过程Mg<sup>2+</sup>始终保持最佳浓度, 提高扩增效率。其PCR产物为平末端, 可加A处理再与T载体连接或使用平末端克隆载体, 如TIANGEN 零背景快速连接试剂盒 (目录号: VT204)。

### 质量控制

经检测无外源核酸酶活性; 能有效地扩增人基因组中的单拷贝基因; 室温存放一周, 无明显活性改变。

### 产品特点

1. Fast HiFidelity Polymerase具有超强的3'-5'外切酶活性, 保真性约为Taq DNA Polymerase的80倍。
2. 本产品通过添加独有的延伸增强因子, 使延伸速度和扩增产量得到了显著提高, 延伸速度可提升至15-30 sec/kb, 比Taq DNA Polymerase快2-4倍。
3. 本产品采用了创新的合成亲和性配体技术, 无需额外的激活步骤即可进行高特异性的Hot Start PCR。

### 扩增片段大小

人基因组DNA	~6 kb
大肠杆菌基因组DNA	~10 kb
cDNA	~6 kb
λDNA	~15 kb

### 注意事项

Fast HiFidelity Polymerase的PCR扩增产物进行琼脂糖电泳时, 请使用本产品中5×DNA Loading Buffer, 否则电泳带可能出现扩散现象, 但不影响电泳结果的分析。

## 操作步骤

### 一 PCR反应液的配制:

反应体系: 应在冰上配制反应体系, 所有的试剂使用前均要充分混匀。

组成成分	体积
Template	***
Primer 1* (10 μM)	2.0 μl
Primer 2* (10 μM)	2.0 μl
5× Fast HiFidelity PCR Buffer	10.0 μl
Fast HiFidelity Polymerase	1.0 μl
(20× Fast PCR Enhancer**)	(2.5 μl)
(DMSO****)	(1-2.5 μl)
ddH <sub>2</sub> O	至50 μl

\*引物终浓度为0.4 μM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 μM间进行优化选择。

\*\*20× Fast PCR Enhancer对一些复杂模板的扩增有明显改善, 当扩增效果不佳时请尝试添加使用。

\*\*\*模板DNA量请参照如下 (50 μl 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	5-200 ng	100-200 ng
质粒DNA	0.1-100 ng	1-10 ng
cDNA	50-200 ng	50-100 ng
λDNA	10 pg-10 ng	1-10 ng

\*\*\*\*对于GC含量高的片段, PCR扩增时加入终浓度2-5% DMSO可改善扩增效果。如果使用DMSO, 请使用三步法, 或使用T<sub>m</sub>值68℃以上的引物。

### 二 PCR反应条件:

1. 使用Fast HiFidelity Polymerase进行扩增反应时, 请先使用三步法。进行三步法扩增时, 为了获得最佳的扩增效果, 建议按延伸速度30 sec/kb进行设定。

### 三步法:

94℃	2 min	} 35 cycles
94℃	15 sec	
60℃ §	10 sec	
68℃	15-30 sec/kb	
68℃	5 min	

§ 退火温度为60℃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60-68℃范围内适当增加退火温度; 如果引物T<sub>m</sub>值小于63℃, 可以将退火温度按T<sub>m</sub>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Step down PCR (降落PCR)。

94℃	2 min	} 35 cycles
94℃	15 sec	
68℃	30 sec/kb	
68℃	5 min	

3. 结果检测: 反应结束后取5 μl反应产物, 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 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	将延伸时间延长为1 min/ kb
		增加2-5个循环
	模板过量或纯度不佳	使用Step down PCR(针对6 kb以上扩增片段效果明显)
		减少cDNA模板用量(以减少对PCR的抑制作用)
	模板复杂	使用20× Fast PCR Enhancer 按终浓度2-5%添加 DMSO
引物降解或设计不合理	重新配制或设计引物	
酶量过少	对50 μl反应体系, 将酶量从标准的2.5 U增加到到3.75-5 U	
杂带或弥散	循环条件不合适	尝试两步法或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(引物较长些往往可消除弥散、杂带现象)
	模板过量	按照说明书中推荐模板用量添加
	酶量过多	对50 μl反应体系, 将酶量从标准的2.5U减少到1.25-2 U