



2× HiPerFi Master Mix

PCR602

产品概述

Product Overview

HiPerFi DNA Polymerase 是一款具有校正功能、热启动特性以及通用退火温度的高保真 DNA 聚合酶，专为对扩增准确性要求较高的 PCR 应用而设计，包括分子克隆、测序和定点突变等。该酶具备长达 20 kb 的稳定扩增能力，其保真度可达 Taq DNA 聚合酶的 280 倍。同时，HiPerFi DNA Polymerase 兼具 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'核酸外切酶校正活性，扩增产物为平末端，适用于无缝克隆等后续实验操作。

HiPerFi Master Mix 是该酶的预混配方产品，含 HiPerFi DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺等 PCR 反应所需全部组分。只需加入模板和引物即可进行扩增，减少移液操作，提高检测通量并确保结果稳定性。

产品组成

Product Composition

| 组 分 | PCR602A 40 rxns/50 μL | PCR602B 600 rxns/50 μL |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| 2× HiPerFi Master Mix | 1 mL | 15×1 mL |

注意事项

Precautions

1. 为保证扩增效果请使用高质量模板。
2. 无法读取引物和模板链中的 dUTP 衍生物或 dITP。
3. 所有操作请在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20°C 保存。
4. 为了防止 HiPerFi DNA Polymerase 的校对活性降解引物，请将聚合酶Mix最后加入反应体系中。
5. HiPerFi DNA Polymerase 具有较强的校对活性。若扩增产物需要进行 TA 克隆，加 A 之前必须进行 DNA 纯化。

操作流程

Operation Process

◆ 制备 PCR 预混液

| 组 分 | 最终浓度 | 50 μL 体系 |
|-----------------------------|----------------------------|----------|
| 2× HiPerFi Master Mix | 1× | 25 μL |
| 10 μM Forward primer | 0.5 μM ^{*1} | 2 μL |
| 10 μM Reverse primer | 0.5 μM ^{*1} | 2 μL |
| Template DNA | 根据不同模板选择反应浓度 ^{*2} | X μL |
| DNase Free H ₂ O | — | to 50 μL |

*1 目的片段 > 5 kb，可将引物终浓度降低至 0.2 μM；

*2 不同模板 50 μL 体系推荐模板使用量：

- 1) 低复杂度 DNA (如质粒、λ噬菌体或 BAC DNA) : 0.1-10 ng/50 μL 反应体系; 可在 0.1 pg-50 ng/50 μL 反应体系范围内调整; 长片段目的基因建议使用更高模板量。
- 2) 基因组 DNA: 5-100 ng/50 μL 反应体系, 可在 0.1-250 ng/50 μL 反应体系范围内调整。长片段目的基因建议使用更高模板量。
- 3) cDNA: 最佳用量为每 50 μL 反应体系中加入第一链 cDNA 反应产物 0.1-1 μL。

混均后短暂离心。

◆ 反应程序

| 循环步骤 | 温 度 | 时 间 | 循环数 |
|------------------|------|----------------|---------|
| 预变性 | 98°C | 30 sec | 1 |
| 变性 | 98°C | 10 sec | 25 – 35 |
| 退火 ^{*1} | 60°C | 10 sec | |
| 延伸 | 72°C | 15 – 30 sec/kb | |
| 最终延伸 | 72°C | 5 min | 1 |
| 保温 | 4°C | – | – |

*1 a: 当上下游引物Tm值都>50°C, 退火温度建议使用60°C; b: 当上下游引物Tm值有一条或均值≤50°C, 退火温度推荐使用50°C; c: 也可根据引物Tm值设定退火温度。

◆ 体系优化

1. 引物

- 1) 引物设计: 引物长度在 18-35 bp, GC 含量尽量在 40%-60%。如果可能, 引物的 3'末端应包含一个或两个 G 或 C 碱基。避免设计出 3'端具有互补性或解链温度 (Tm) 差异大于 5°C 的引物对。
- 2) 引物浓度: 推荐引物的终浓度为 0.5 μM, 但如有需要, 可在 0.1 μM - 1.0 μM 的范围内调整。对于从高复杂度 DNA (如哺乳动物基因组 DNA) 中扩增 > 5 kb 的目标片段, 建议降低引物浓度 (终浓度 0.2 μM)。

2. 变性温度

使用 98°C。注意: 确保加热盖温度设定在 98°C以上几度, 以避免样品冷凝;

初始变性时间: 对于大多数模板, 在 98°C下进行 30 s的初始变性是足够的。如有需要, 可将初始变性时间延长至 5 min。

3. 退火

标准退火温度: 由于缓冲液中含独特的等温稳定分子, 60°C退火温度适用于大多数引物。若扩增效果不佳, 建议使用温度梯度优化退火温度。

4. 延伸

延伸时间取决于扩增产物长度和模板复杂度: 低复杂度 DNA (如质粒、λ噬菌体或 BAC DNA): 15sec/kb; 高复杂度基因组 DNA: 30 sec/1kb。对于 ≥ 5 kb 的目标片段, 延伸时间可延长至 90 sec/kb。

保存条件

Storage Conditions

-20°C保存, 干冰/-20°C运输。保质期限: 24个月。