



HiPerFi DNA Polymerase

PCR601

产品概述

Product Overview

HiPerFi DNA Polymerase 是一款集成了校正功能、热启动技术及通用退火温度的高保真 DNA 聚合酶，专为分子克隆、测序、定点突变等对扩增准确性要求较高的 PCR 实验而开发。该酶采用热启动技术与优化缓冲体系，可有效抑制非特异性扩增，并凭借通用退火温度实现对不同 GC 含量靶标的高效扩增，无需额外添加变性助剂。其稳定扩增能力可达 20 kb，保真度为 Taq DNA 聚合酶的 260 倍。该酶同时具备 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应用。

产品组成

Product Composition

组 分	PCR601A 100 U	PCR601B 1000 U
2 × HiPerFi Buffer	2 × 1.25 mL	20 × 1.25 mL
HiPerFi DNA Polymerase	100 μL	10 × 100 μL
10 × DNA Loading buffer	1.25 mL	10 × 1.25 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℃ 保存。
4. 由于聚合酶储存缓冲液中甘油含量高(50%)，粘度大，取用时应小心轻柔，防止加入量不准确。
5. 为了防止 HiPerFi DNA Polymerase 的校对活性降解引物，请将聚合酶最后加入反应体系中。
6. 如实验需要，可适当提高酶的使用量，但 50 μL 体系内 HiPerFi DNA Polymerase 酶量建议不要超过 2 U。
7. 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 Buffer ^{*1}	1 ×	25 μL
HiPerFi DNA Polymerase	—	1 μL
10 μM Forward primer	0.5 μM ^{*2}	2 μL
10 μM Reverse primer	0.5 μM ^{*2}	2 μL
Template DNA	根据不同模板选择添加量 ^{*3}	X μL
DNase Free H ₂ O	—	to 50 μL

*1 包含 8.75 mM MgCl₂;

*2 目的片段 > 5 kb, 可将引物终浓度降低至 0.2 μM;

*3 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。

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。

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 0.1-2 μL。

混匀后短暂离心。

◆ 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	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	–	–

◆ 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 (T_m) 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 秒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/kb。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: 24个月。