



|                     |         |         |
|---------------------|---------|---------|
| 产品货号                | G02C02S | G02C02M |
| 2×HI-FI PCR Mix     | 1 mL    | 5×1 mL  |
| Nuclease-Free Water | 1 mL    | 5×1 mL  |

### 【产品介绍】

2× HI-FI PCR Mix采用经基因工程改造的Pfu高保真DNA聚合酶，具有高保真特性，其保真度是Taq DNA Polymerase的70多倍。同时，本产品可扩增长片段：

- ▶ 使用λ DNA等简单模板，可有效扩增长达40kb的片段；
- ▶ 使用基因组DNA等复杂模板，可有效扩增长达20kb的片段；
- ▶ 使用cDNA模板，可有效扩增长达10kb的片段。

此外，2×HI-FI PCR Mix对PCR抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接PCR。

### 【使用方法】

#### 1. 常规 PCR 反应体系

| 试剂                            | 使用量      | 终浓度    |
|-------------------------------|----------|--------|
| 2× HI-FI PCR Mix <sup>a</sup> | 25 μL    | 1×     |
| 正向引物 (10 μM) <sup>b</sup>     | 2 μL     | 0.4 μM |
| 反向引物 (10 μM) <sup>b</sup>     | 2 μL     | 0.4 μM |
| DNA 模板 <sup>c</sup>           | X μL     |        |
| Nuclease-Free Water           | To 50 μL |        |

- a. 2×HI-FI PCR Mix 中已含有 Mg<sup>2+</sup>，终浓度为2mM；
- b. 引物推荐终浓度为0.4 μM，效果不佳时可以在0.1~1 μM浓度范围内进行调整；
- c. 不同模板最佳反应浓度有所不同，以50 μL体系为例：模板为基因组DNA时，一般推荐的使用量为50~400ng；模板为质粒或病毒DNA，推荐10pg~30ng；模板为cDNA时，推荐的使用量为1~5 μL (≥200ng RNA相当量)。

#### 2. 常规 PCR 反应程序

| 步骤              | 温度     | 时间           |
|-----------------|--------|--------------|
| 预变性             | 95℃    | 2~5 min      |
| 变性              | 95℃    | 25 sec       |
| 退火 <sup>a</sup> | 53~64℃ | 25 sec       |
| 延伸 <sup>b</sup> | 68℃    | 15~30 sec/kb |
| 终延伸             | 68℃    | 5 min        |



- a. 请根据引物 T<sub>m</sub> 值设置退火温度，如果不确定 T<sub>m</sub> 值，可以建立温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度；
- b. 延伸速率设置为30 sec/kb可以满足多数实验，如果扩增效果不佳，可以适当延长延伸时间提高扩增产物量。

### 3. 长片段扩增指南

在扩增长片段时，若上述常规 PCR 反应程序不能有效扩增，可使用下表所示 Touch Down 两步法 PCR：

| 步骤  | 温度  | 时间        |       |
|-----|-----|-----------|-------|
| 预变性 | 95℃ | 2~5 min   |       |
| 变性  | 95℃ | 25 sec    |       |
| 延伸  | 74℃ | 30 sec/kb | 5 循环  |
| 变性  | 95℃ | 25 sec    |       |
| 延伸  | 72℃ | 30 sec/kb | 5 循环  |
| 变性  | 95℃ | 25 sec    |       |
| 延伸  | 70℃ | 30 sec/kb | 5 循环  |
| 变性  | 95℃ | 25 sec    |       |
| 延伸  | 68℃ | 30 sec/kb | 25 循环 |
| 终延伸 | 68℃ | 5 min     |       |

**注：请使用高质量的模板，若产量较低可适当提高模板的使用量；推荐使用长引物。**

### 4. 各种样品扩增指南

2×HI-FI PCR Mix 对许多 PCR 抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接 PCR。

| 样品类型  | 扩增方式       | 推荐操作方式 (50 μL 体系)               |
|-------|------------|---------------------------------|
| 全血    | 直接扩增       | 吸取 1~5 μL 作为扩增模板                |
| 滤纸干血清 | 直接扩增       | 剪取 1~2 mm <sup>2</sup> 滤纸作为扩增模板 |
| 培养细胞  | 直接扩增       | 取少量细胞作为扩增模板                     |
| 酵母/细菌 | 直接扩增       | 挑取单克隆或 1 μL 菌液作为扩增模板            |
| 霉菌    | 直接扩增       | 挑取少量作为扩增模板                      |
| 精液    | 直接扩增       | 挑取少量作为扩增模板                      |
| 浮游生物  | 直接扩增       | 挑取少量作为扩增模板                      |
| 植物组织  | 直接扩增       | 剪取 1~2 mm <sup>2</sup> 组织作为扩增模板 |
| 小鼠尾巴  | 裂解后吸取裂解液扩增 | 吸取 1~5 μL 裂解液作为扩增模板             |
| 食品    | 裂解后吸取裂解液扩增 | 吸取 1~5 μL 裂解液作为扩增模板             |

**注：建议使用以下方法进行样品裂解液制备，取少量动物组织/食品样品浸泡 100 μL Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1%SDS, pH=8.0) 中，补加蛋白酶 K 至终浓度 200 μg/mL，经 60℃ 温育 10 min，95℃ 温育 10 min 后，混匀并离心取上清作为扩增模板。**

### 5. 引物设计原则

- 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- 引物 3' 端应避免出现发夹结构；
- 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3' 端避免有 3 个碱基以上的互补序列；
- 正向引物和反向引物的 T<sub>m</sub> 值相差不超过 1℃ 为佳，T<sub>m</sub> 值调整至 55~65℃ 为佳（引物 T<sub>m</sub> 值推荐使用 Primer Premier 5 进行计算）；
- 使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

**【注意事项】**

- 长期保存请于-20℃保存，避免反复冻融。
- 请使用高质量的模板。
- 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物和模板。
- 如果扩增产物需要进行 T/A 克隆，加 A 之前请进行 DNA 纯化。
- 此产品仅用于科学研究用途，不可用于临床诊断。

**【质量控制】**

- **宿主残留 DNA 检测**  
经 E. coli 16s rDNA 特异性的 TaqMan qPCR 检测，E. coli 基因组残留低于 10 拷贝。
- **核酸内切酶残留检测**  
将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37℃温育 4h，通过 DNA 电泳检测质粒无变化。
- **核酸外切酶残留检测**  
将酶液与双链 DNA 底物在 37℃温育 16h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。
- **功能检测**  
分别以 λDNA、质粒 DNA 和人基因组 DNA 为模板，扩增不同长度的 3 个片段，35 个循环后将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，经核酸染料染色，可见目的条带。

**【常见问题】**

| 问题描述     | 可能原因  | 解决办法                  |
|----------|-------|-----------------------|
| 无产物或产物量少 | 退火温度  | 设置退火温度梯度，找到合适的退火温度    |
|          | 引物浓度  | 适当提高引物浓度              |
|          | 延伸时间  | 适当增加延伸时间至 30~60sec/kb |
|          | 循环数   | 增加循环数至 35~40 个循环      |
|          | 模板纯度  | 使用高纯度模板               |
|          | 模板使用量 | 使用量可参照反应体系推荐量并适量增加。   |
| 有杂带或弥散条带 | 引物特异性 | 优化引物设计，提高特异性          |
|          | 退火温度  | 尝试提高退火温度并设置退火温度梯度     |
|          | 引物浓度  | 降低引物浓度至终浓度为 0.2 μM    |
|          | 延伸时间  | 有大于目标条带的杂带时可适当减少延伸时间  |
|          | 循环数   | 减少循环数至 25~30 个循环      |
|          | 反应程序  | 使用 Touch down PCR 程序  |
|          | 模板纯度  | 使用高纯度模板               |
|          | 模板使用量 | 使用量参照反应体系推荐量调整或适当减少。  |

**【相关产品】**

| 货号     | 产品名称                           | 规格           |
|--------|--------------------------------|--------------|
| G02C01 | 2×PCR Mix (+Dye)               | 1mL/5mL/50mL |
| G02C03 | SYBR Green qPCR Mix (None Rox) | 1mL/5mL      |
| G02C04 | SYBR Green qPCR Mix (Low Rox)  | 1mL/5mL      |
| G02C05 | SYBR Green qPCR Mix (High Rox) | 1mL/5mL      |

Version: 20190506 (第一版)