

QKGEN[®] 2xHiFi HotStart ReadyMix

(高保真 PCR 扩增试剂盒)

产品描述

本产品内含的热启动高保真 DNA 聚合酶是一种经过生物加工改造的新型 B 族 DNA 聚合酶，对 DNA 具有更高的亲和力，与野生型 B 族 DNA 聚合酶相比，这种酶固有的高延伸能力，能显著改善产量、催化速度和灵敏度。此外，还能显著改善扩增长片段靶标的的能力，以及扩增高 GC 和高 AT 靶标的的能力。这种酶与专用抗体结合，能够抑制酶直至第一次变性步骤，从而可防止在反应体系配制期间发生非特异性扩增，还能提高灵敏度，并改善反应效率。本品以方便的 2x 预混液形式提供，其中包含了除引物和模板之外的所有反应组分，每份 1x 浓度的 ReadyMix 反应体系中含有 0.3 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、0.5U HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶(每 25 μL 反应含 0.5U)和稳定剂。

产品信息

| 产品名称 | 规格 | 货号 |
|----------------------------|-------------|---------|
| 2×HiFi Hot Start Ready Mix | 50 T/1.25ml | QKK0050 |
| 2×HiFi Hot Start Ready Mix | 250T/6.25ml | QKK0250 |

运输与储存条件 -15 ~ -25°C，干冰或冰袋运输

产品特点

- ❖ 本试剂盒包含精心设计的热启动高保真 DNA 聚合酶 - 专为快速和全能型的高保真 PCR 而开发。
- ❖ 一份 2x 预混液提供了缓冲液、MgCl₂、dNTPs 和酶，使用方便，只需再添加引物和模板即可。
- ❖ 高保真，错配率低（每加入 3.6 x 10⁶ 个核苷酸才会发生 1 个错误），保真度是野生型 Taq DNA 聚合酶的 100 倍，是其他 B 族 DNA 聚合酶和聚合酶混合物的保真度的 10 倍以上。

- ❖ 具有 5'→3'聚合酶和 3'→5'外切酶(校正) 活性, 但没有 5'→3'外切酶活性。
- ❖ 从基因组 DNA 扩增高达 15 kb 的靶标, 低复杂度的靶标可扩增 20 kb。
- ❖ 扩增生产的 PCR 产物是平末端, 但可以加 3'-dA 尾, 应用于 TA 克隆。

产品应用

- ◆ 常规测序的 PCR (直接测序或克隆 PCR 产物的测序)
- ◆ 高通量测序文库扩增步骤
- ◆ 扩增 DNA 片段用于克隆和蛋白质表达或基因组表征
- ◆ 定点突变

注意事项

1. 本品含有热启动酶, 需注意尽量避免长时间置于室温环境下, 以免酶失活, 试剂失效。
2. 避免试剂反复冻融, 大包装试剂可进行分装保存。
3. 关于退火温度:

由于本品预混液的盐浓度较高, 故其特定引物组的最佳退火温度通常与其他缓冲液系统不同。当首次使用含有特定引物对试剂盒时, 可通过退火温度梯度 PCR 来确定最佳退火温度。我们推荐使用 60~72℃ 的梯度, 但某些检测可能需要更高的退火温度。对于最佳退火温度为 68℃ 或更高的检测, 可以在最佳退火温度下进行两步法循环扩增。但在使用 AT 含量较高的引物时可能需要低于 60℃ 的退火温度。如果梯度 PCR 不可行, 则首选 65℃ 的退火温度, 并根据获得的结果调整退火温度:

- (1) 如果仅获得了特异性产物, 但产量较低, 则将退火温度调低 1-2℃。
- (2) 如果除特异性产物之外还形成了非特异性产物, 则将退火温度调高 1-2℃。
- (3) 如果没有产物(特异性或非特异性), 则将退火温度调低 5℃。还可能需增加 MgCl₂ 浓度。
- (4) 如果仅形成了非特异性产物(呈阶梯样模式), 则将退火温度调高 5℃, 或尝试针对 GC 含量高的 PCR 的推荐方案(参见重要参数: GC 含量 高的 PCR)。

4. 关于引物和模板 DNA 的质量:

引物设计和质量是影响 PCR 成功的一个关键因素。应仔细设计引物, 以尽可能地消除出现引物二聚体和非特异性退火的可能性, 并且需要将 GC 含量控制在 40-60% 。

GC 含量>60%的引物可能需要更高的变性温度和/或更长的变性时间，而 GC 含量<40%的引物可能需要退火温度<60℃，和/或增加 MgCl₂ 和引物浓度。此外，引物组设计时应具有相似的理论变性温度。

高质量的模板 DNA 对于高保真度扩增也是至关重要。当扩增较长的片段(> 1kb)时，存在降解、损坏 或剪切问题的模板 DNA 尤为困难。为了防止降解并保持 DNA 质量，需要始终在缓冲液(例如 10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5)中稀释和储存，而不是直接储存在水中。

从低复杂度模板(例如质粒 DNA) 进行扩增，通常极少需要优化。基于低靶标拷贝数的应用(例如，当从基因组模板扩增单拷贝基因时，或当使用 cDNA 作为模板时)通常更具挑战性。对于质粒 DNA，每 25 μL 反应使用 1-10 ng 模板就足够了，而对于复杂的基因组 DNA 或 cDNA，则可能需要多达 100 ng 的模板。

5. 关于 MgCl₂ 浓度:

本品预混液含有 2.5 mM 的最终浓度(1X) MgCl₂，足以满足大多数应用。但有一些应用可能需要更高的 MgCl₂ 浓度:比如长片段 PCR (> 10kb)和 AT 含量高或 GC 含量低(<40%)的扩增。

6. 关于 GC 含量高的模板:

对于 GC 含量高的扩增子，可向反应中可加入 5% DMSO、或 1 M 甜菜碱，以提高产量和/或特异性。

实验流程

1. 反应体系配制，取出试剂并确保试剂完全溶解和混匀。
2. 按照下表配制反应体系，并充分混匀后短暂离心，进行下一步 PCR 反应。

| 组份 | 终浓度 | 25 μl 体系(μl) | 50 μl 体系(μl) |
|----------------------------|---------------|--------------|--------------|
| 2×HiFi Hot Start Ready Mix | 1 × | 12.5 | 25 |
| Templat DNA | - | 根据需要 | 根据需要 |
| 正向引物 | 0.1 μM-0.5 μM | - | - |
| 反向引物 | 0.1 μM-0.5 μM | - | - |
| Nuclease-free Water | - | Up to 25 | Up to 50 |

3. PCR 反应条件

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----|---------|-------------|-------|
| 预变性 | 95°C | 3min | 1 |
| 变性 | 98°C | 20sec | 15-35 |
| 退火 | 60~70°C | 15~30sec | |
| 延伸 | 72°C | 15~60sec/kb | |
| 终延伸 | 72°C | 1min/kb | 1 |
| 保持 | 10°C | ∞ | 1 |

注意：根据具体实验摸索退火延伸时间。

- 1) 当进行文库扩增时，PCR 反应条件可根据文库构建试剂盒的说明书操作。
- 2) 预变性：对于大多数应用，在 95°C 下预变性 3 分钟即已足够。对于 GC 含量高 (> 70%GC 含量) 的靶标，需要在 95°C 下预变性 5 分钟。
- 3) 本高保真酶预混液的盐浓度比传统 PCR 预混物的更高，这会影响 DNA 变性。为确保复杂且 GC 含量高的靶标完全变性，在循环过程中使用 98°C 的温度变性。
- 4) 退火温度：退火温度的选择参考注意事项 3。
- 5) 可以使用两步扩增法，其中退火/延伸温度在 68~75°C 的范围内，退火/延伸时间为 30 秒/kb。
- 6) 对于 ≤1kb 的靶标，每个循环使用 15 秒延伸，而对于较长的片段，或为了提高产量，可使用 30~60 秒/kb 延伸。
- 7) 为获得最高的保真度，需使用 ≤25 个循环。在模板浓度非常低或反应效率低导致产量低的情况下，可进行 30-35 个循环，以产生足够用于下游应用的产物。

常见问题与解决方法

| 问题 | 可能的原因 | 解决方案 |
|-----------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 无扩增或低产量 | 循环方案 | 使用在 95℃ 下预变性 3-5 分钟的推荐方案，并在 98℃ 下进行循环变性 20 秒。 将延伸时间增加至最多 1 分钟/kb。 增加循环数。 |
| | 退火温度太高 | 将退火温度降低 5℃。 通过梯度 PCR 优化退火温度。 |
| | 模板 DNA 数量和质量 | 模板中还有 EDTA 等杂质螯合预混液中的 Mg^{2+} 。 将模板浓度降低至 <100 ng，或增加 $MgCl_2$ 。 检查模板 DNA 质量，检测模板是否降解。若降解，需要更换高质量的 DNA。 |
| | 引物浓度 | 一些引物的退火效率要高于其他引物。增加引物浓度，或优化 $MgCl_2$ 以改善引物结合。 |
| | $MgCl_2$ | 优化 $MgCl_2$ 浓度。AT 含量高的 PCR 通常需要更多的 $MgCl_2$ 。 |
| 非特异性扩增或污染 | 模板 DNA | 每次反应使用 <100 ng 的 DNA，或减少循环次数。 检查模板 DNA 质量。 |
| | 循环方案 | 过长的退火和/或延伸时间将导致非特异性扩增，通常是比靶标条带更大的条带。将退火和延伸时间减少到各最少 10 秒。 减少循环数。 |
| | 退火温度太低 | 欠佳的退火温度将导致出现通常小于靶标条带的非特异性扩增子。请参考注意事项 3 选择最佳退火温度。 |
| | 靶标 GC 含量 | 向反应中加入 5% DMSO 或 1 M 甜菜碱，以促进 GC 含量高的模板变性。 |
| | 引物浓度 | 一些引物的退火效率要高于其他引物。降低引物浓度。 |