

Fast HiFidelity PCR Kit

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, Mg²⁺, 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Mg²⁺自动调节系统，在整个反应过程Mg²⁺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
λ DNA	~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 μ M)	2.0 μ l
Primer 2* (10 μ M)	2.0 μ l
5 \times Fast HiFidelity PCR Buffer	10.0 μ l
Fast HiFidelity Polymerase	1.0 μ l
(20 \times Fast PCR Enhancer**)	(2.5 μ l)
(DMSO****)	(1-2.5 μ l)
ddH ₂ O	至50 μ l

*引物终浓度为0.4 μ M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 μ M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_m值68°C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°C	2 min	
94°C	15 sec	} 35 cycles
60°C §	10 sec	
68°C	15-30 sec/kb	
68°C	5 min	

§ 退火温度为60°C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°C范围内适当增加退火温度；如果引物T_m值小于63°C，可以将退火温度按T_m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°C	2 min	
94°C	15 sec	} 35 cycles
68°C	30 sec/kb	
68°C	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
		使用Step down PCR(针对6 kb以上扩增片段效果明显)
	模板过量或纯度不佳	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	