

#J10006

## 2X High-Fidelity Master Mix

(With dye)

- 1 ml (20 ul 反应×100 次)
- 5 ml (20 ul 反应×500 次)



**Order** 021-34695924  
orders@ab-mart.com

**Support** 400-6123-828  
support1@ab-mart.com

**Web** www.abmart.cn

### 产品描述

该产品 2X High-Fidelity Master Mix 能够为大部分 PCR 应用同时提供高保真性，强大的扩增能力和更快的扩增速度。该 DNA 聚合酶增加了保真度和速度，高保真度使得 DNA 聚合酶成为分子克隆或其他后续应用的较优选择。其错误率比 Taq DNA 聚合酶低 50 倍，比 Pyrococcus Furious DNA 聚合酶低 6 倍。该 DNA 聚合酶具有 5→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性。它会在扩增产物两端产生平端，而没有 A 突出(A 突出通常出现在用 Taq 聚合酶扩增的产物中)。在实验中我们的聚合酶能够扩增长达 10 kb 的片段。在 PCR 反应中，DNA 聚合酶的延伸速率约为 15-30 sec / kb(取决于基因的复杂性)。2X High-Fidelity Master Mix (With dye) 是一种即用型 2X 预混液，已经优化的缓冲系统和染料。我们的产品适应于多种检测，PCR 产物可以在扩增后直接进行电泳，而无需添加上样缓冲液。

如果后续实验是克隆，则产品 2X High-Fidelity Master Mix (货号#J10005) 不含染料版本是您更合适的选择。

### 产品储存

将 master mix 储存于-20°C。

### 使用指南

#### 在冰上进行实验操作

我们建议将所有反应组分放在冰上。打开产品后确认全部解冻，以确保均一性。由于该酶具有 3'→5'核酸外切酶活性，在缺乏 dNTP 的情况下也许可能降解引物，因此 2×High-Fidelity Master Mix 应最后添加到 PCR 混合物中。由于 DNA 聚合酶的性质，请注意使用 DNA 聚合酶的实验操作指南，可能与其他聚合酶的指南不同。

Components	20 µl reaction	50 µl reaction	FINAL CONCENTRATION
ddH <sub>2</sub> O	add to 20 µL	add to 50 µL	
10 µM Forward Primer	0.8 µL	2 µL	0.4 µM
10 µM Reverse Primer	0.8 µL	2 µL	0.4 µM
Template	Variable	variable	< 250 ng
2×High-Fidelity Master Mix	10 µL	25 µL	

a. 推荐的最终引物浓度为 0.4 µM，但可以在 0.2-1.0 µM 范围内变化，您可以调整浓度。一般推荐寡核苷酸引物长度在 20-40 bp 之间，理想的 GC 含量为 40-60%。

b. 使用高质量纯化的 DNA 模板可以大大提高 PCR 反应的成功率。对于低复杂度 DNA (例如质粒、病毒、λ 或 BAC DNA)，DNA 模板量可以在每 50 µL 反应体积 1pg-10ng 之间。对于高

复杂度的基因组 DNA，每 50  $\mu$ L 反应体积 DNA 模板量应为 50-250 ng。如果从 cDNA 合成反应中获得模板 DNA，则模板的体积不应超过最终 PCR 反应体积的 10%。

#### 轻柔的混匀反应体系，并在离心机中离心。

实验者应迅速将反应体系转移至预热至变性温度（98 $^{\circ}$ C）的 PCR 仪。

如果 PCR 仪没有热盖，请使用矿物油覆盖样品。

#### PCR 循环条件

	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98 $^{\circ}$ C	1min	1
Denaturation	98 $^{\circ}$ C	15s	25-35 循环 variable
Annealing	55-58 $^{\circ}$ C(可调)	15s	
Extension	72 $^{\circ}$ C	15-30s per kb	
Final extension	72 $^{\circ}$ C	2min	1
Hold	4 $^{\circ}$ C		1

- 对于大多数模板，我们建议在 98 $^{\circ}$ C 下进行 1 分钟的预变性。一些模板可能需要更长的预变性时间，预变性时间的长度可以延长至 3 分钟。
- DNA 聚合酶的最佳退火温度可能与基于 Taq 的聚合酶明显不同。DNA 聚合酶具有稳定引物模板杂交的能力。对于大多数模板，我们建议使用 55-58 $^{\circ}$ C 的退火温度 10-30 秒。如有必要，使用温度梯度来找出每个模板-引物对组合的最佳退火温度。
- 延伸时间取决于扩增子的长度和复杂性。对于低复杂度的 DNA（例如质粒、病毒、 $\lambda$  或 BAC DNA），每 1kb 使用 15 秒的延伸时间。对于高复杂度的基因组 DNA，建议每 1 kb 30 秒。对于一些 cDNA 模板，延伸时间可以增加至每 1kb 40 秒，以获得最佳结果。对于大部分模板，每 1 kb 20 秒可以使用。
- 当引物  $T_m$  值至少为 69 $^{\circ}$ C (>20 nt) 或 72 $^{\circ}$ C ( $\leq$ 20 nt) 时，推荐使用两步法。在 2 步法中，即使当引物  $T_m$ > 72 $^{\circ}$ C 时，组合退火/延伸步骤也应在 72 $^{\circ}$ C 下进行。

#### 注意点

- 该聚合酶退火温度不同于许多常见的 DNA 聚合酶（如 Taq DNA 聚合酶）。有关于酶的退火温度的设置，**我们推荐在 55-58 $^{\circ}$ C。如果在该温度下**，您无法获得较为理想的实验结果，可以尝试设置梯度退火温度，以优化实验条件。
- 使用 15-30 s / kb 的扩展速度。不要超过 1 分钟 / kb。
- 该 DNA 聚合酶产生平末端 DNA 产物。
- 该酶的聚合能力较强，实验者在 PCR 的整个实验过程中请在冰上操作，否则室温下酶具有活性，有可能将引物聚合形成引物二聚体，引物消耗后，PCR 效率将会降低。