

#J10005



2X High-Fidelity MasterMix

- 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 是一种即用型 2X 预混液，其中包含聚合酶，dNTP，和已经优化的缓冲系统。

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
ddH2O	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 µL 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℃）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℃	1min	1
Denaturation	98℃	15s	25-35 循环 variable
Annealing	55-58℃(可调)	15s	
Extension	72℃	15-30s per kb	
Final extension	72℃	2min	1
Hold	4℃		1

- 对于大多数模板，我们建议在 98℃ 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℃ 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、λ 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℃ (>20 nt) 或 72℃ (≤20 nt) 时，推荐使用两步法。在 2 步法中，即使当引物 T_m> 72℃ 时，组合退火/延伸步骤也应在 72℃ 下进行。

电泳

如果需要对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，我们的产品 **SYBR Safe DNA Gel Stain(货号: J10003)** 该产品安全低毒，推荐您选择使用。

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℃。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。
- 使用该 DNA 聚合酶产生的 PCR 产物具有平末端。如果下一步是克隆，那么推荐使用平端克隆。**如果您期望选择 T/A 克隆，那么 DNA 应该在 A 突出加入前纯化（任何剩余的该 DNA 聚合酶将降解 A 突出，再次产生平端）。**可以用 Taq DNA 聚合酶或 Klenow exo-酶添加无模板的 A 突出。实验者可以在 10 μL 反应混合物中用 1x Taq 缓冲液，2.5mM MgCl₂，0.2mM dATP 和 1U Taq DNA 聚合酶在 72℃ 孵育 30 分钟。