



# HiPerFi DNA Polymerase

## PCR601

### 产品概述

Product Overview

HiPerFi DNA Polymerase 是一款集成了校正功能、热启动技术及通用退火温度的高保真 DNA 聚合酶，专为分子克隆、测序、定点突变等对扩增准确性要求较高的 PCR 实验而开发。该酶采用热启动技术与优化缓冲体系，可有效抑制非特异性扩增，并凭借通用退火温度实现对不同 GC 含量靶标的高效扩增，无需额外添加变性助剂。其稳定扩增能力可达 20 kb，保真度为 Taq DNA 聚合酶的 260 倍。该酶同时具备 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 核酸外切酶校正活性，扩增产物为平末端，适用于无缝克隆等后续应用。

### 产品组成

Product Composition

| 组 分                     | PCR601A<br>100 U | PCR601B<br>1000 U |
|-------------------------|------------------|-------------------|
| 2 × HiPerFi Buffer      | 2 × 1.25 mL      | 20 × 1.25 mL      |
| HiPerFi DNA Polymerase  | 100 μL           | 10 × 100 μL       |
| 10 × DNA Loading buffer | 1.25 mL          | 10 × 1.25 mL      |

### 注意事项

Precautions

- 为保证扩增效果请使用高质量模板。
- 无法读取引物和模板链中的 dUTP 衍生物或 dITP。
- 所有操作请在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回 -20°C 保存。
- 由于聚合酶储存缓冲液中甘油含量高(50%)，粘度大，取用时应小心轻柔，防止加入量不准确。
- 为了防止 HiPerFi DNA Polymerase 的校对活性降解引物，请将聚合酶最后加入反应体系中。
- 如实验需要，可适当提高酶的使用量，但 50 μL 体系内 HiPerFi DNA Polymerase 酶量建议不要超过 2 U。
- HiPerFi DNA Polymerase 具有较强的校对活性。若扩增产物需要进行 TA 克隆，加 A 之前必须进行 DNA 纯化。

### 操作流程

Operation Process

#### ◆ 制备 PCR 预混液

| 组 分                              | 最终浓度                      | 50 μL 体系 |
|----------------------------------|---------------------------|----------|
| 2 × HiPerFi Buffer <sup>*1</sup> | 1 ×                       | 25 μL    |
| HiPerFi DNA Polymerase           | —                         | 1 μL     |
| 10 μM Forward primer             | 0.5 μM <sup>*2</sup>      | 2 μL     |
| 10 μM Reverse primer             | 0.5 μM <sup>*2</sup>      | 2 μL     |
| Template DNA                     | 根据不同模板选择添加量 <sup>*3</sup> | X μL     |
| DNase Free H <sub>2</sub> O      | —                         | to 50 μL |

\*1 包含 8.75 mM MgCl<sub>2</sub>;

\*2 目的片段 > 5 kb, 可将引物终浓度降低至 0.2 μM;

\*3 不同模板 50 μL 体系推荐模板使用量:

- 1) 低复杂度 DNA (如质粒、λ 噬菌体或 BAC DNA) : 0.1-10 ng/50 μL 反应体系; 可在 0.1 pg-50 ng/50 μL 反应体系范围内调整。
- 2) 基因组 DNA: 5-100 ng/50 μL 反应体系, 可在 0.1-250 ng/50 μL 反应体系范围内调整。
- 3) cDNA: 最佳用量为每 50μL 反应体系中加入第一链 cDNA 反应产物 0.1-2 μL。

混匀后短暂离心。

#### ◆ 反应程序

| 循环步骤 | 温度   | 时间             | 循环数       |
|------|------|----------------|-----------|
| 预变性  | 98°C | 30 sec         | 1         |
| 变性   | 98°C | 10 sec         | } 25 – 35 |
| 退火   | 60°C | 10 sec         |           |
| 延伸   | 72°C | 15 – 30 sec/kb |           |
| 最终延伸 | 72°C | 5 min          | 1         |
| 保温   | 4°C  | –              | –         |

#### ◆ 体系优化

##### 1. 引物

- 1) 引物设计: 引物长度在 18-35 bp, GC 含量尽量在 40%-60%。如果可能, 引物的 3'末端应包含一个或两个 G 或 C 碱基。避免设计出 3'端具有互补性或解链温度 (T<sub>m</sub>) 差异大于 5°C 的引物对。
- 2) 引物浓度: 推荐引物的终浓度为 0.5 μM, 但如有需要, 可在 0.1 μM - 1.0 μM 的范围内调整。对于从高复杂度 DNA (如哺乳动物基因组 DNA) 中扩增 > 5 kb 的目标片段, 建议降低引物浓度 (终浓度 0.2 μM)。

##### 2. 变性温度

使用 98°C。注意: 确保加热盖温度设定在 98°C 以上几度, 以避免样品冷凝;

初始变性时间: 对于大多数模板, 在 98°C 下进行 30 秒的初始变性是足够的。如有需要, 可将初始变性时间延长至 5 min。

##### 3. 退火

标准退火温度: 由于缓冲液中含独特的等温稳定分子, 60°C 退火温度适用于大多数引物。若扩增效果不佳, 建议使用温度梯度优化退火温度。

##### 4. 延伸

延伸时间取决于扩增产物长度和模板复杂度: 低复杂度 DNA (如质粒、λ 噬菌体或 BAC DNA): 15sec/kb; 高复杂度基因组 DNA: 30 sec/1kb。对于 ≥ 5 kb 的目标片段, 延伸时间可延长至 90 sec/kb。

#### 保存条件

Storage Conditions

-20°C 保存, 干冰/-20°C 运输。