

2 × A9 LongHiFi PCR MasterMix



武汉科尔普生物科技有限公司
Keep Biotechnologies Co., Ltd

地址：武汉市新技术开发区高新大道 666 号 2 栋
电话：15572895186（微信同号）
网址：www.keepbio.cn 技术 QQ：781634607

使用说明

组成	PC8401	PC8402
2 × A9 LongHiFi PCR MasterMix	1ml	5 ml

储存： -20 °C 保存 2 年。短时间（1 个月内）使用可以置 4 °C。

制品说明：

本产品包含 A9 LongHiFi DNA Polymerase、dNTPs 和优化的反应缓冲液，浓度为 2×。使用时只需加入模板、引物，并补足水至 Mix 终浓度为 1×即可。A9 为多种采用最先进基因工程改造而来的超保真酶添加延伸因子混合而成，极大的提高了扩增长度、扩增速度、保真性和产量。A9 Mix 是长片段超保真快速扩增的首选产品。本制品含红色示踪染料，不需添加上样缓冲液即可直接上样进行电泳；也可经过纯化处理，以用于酶切、连接、荧光测序等后续操作。PCR 产物为平末端，不需要加 A 头，可直接用科尔普 pTOPO Blunt 平末端系列载体（货号 CV16、CV17）克隆。

产品特点：

1. 扩增速度快：延伸速度可以达到 3-4kb/min，是 *pfu* 的 6-8 倍。
2. 扩增产量高：一般 PCR 产物量比传统 *pfu* 产量高 50%-100%。
3. 优异保真性：保真度是 *taq* 的 54 倍以上。一般随机挑一个菌测序便是正确无突变菌落。
4. 扩增长度长：以复杂基因组 DNA 为模板适合扩增不超过 10kb 左右的产物，以简单基因组、质粒和噬菌体 DNA 为模板适合扩增不超过 15kb 左右的产物。

建议 PCR 体系设置：

Component	25 µl Reaction	50 µl Reaction	Final Concentration
2× A9 PCR MasterMix	12.5 µl	25 µl	1 ×
Forward Primer(10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
Reverse Primer(10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
Template DNA	as required	as required	
ddH ₂ O	up to 25 µl	up to 50 µl	

参考模板用量（50 µl 反应体系）：

质粒：0.1-10ng；细菌基因组：10-100ng；人类基因组：50-150ng；cDNA：1-5µl from RT reaction。

建议 PCR 循环条件：

Step	Temperature	Time	Cycle Number
Initial denaturation	95°C	3 minutes	
Denaturation	95°C	10 seconds	30 cycles
Annealing	55°C	10-15 seconds	
Extension	72°C	15-20 seconds / kb	
Final Extension	72°C	2-5 minutes	
	4-8°C	Hold	

注意事项:

1. A9 扩增速度快，质粒和简单基因组等简单模板可以采用 10-15 秒/kb；复杂模板如人类基因组可以采用 20-25 秒/kb。
2. 如果电泳发现主带上下拖尾模糊现象，或者泳道出现从上样孔拖下来的涂抹带现象，一般提示延伸时间过长，梯度缩短延伸时间（建议 10-15 秒/kb 为梯度减少延伸时间）直到获得满意结果。
3. 对于 GC 含量很高的模板，预变性和变性温度可以提高到 98°C。A9 耐热性强，98°C 对 A9 的活性无改变。
4. 如果扩增模板 GC 含量高或者模板复杂扩增效果不佳时，可在反应混合物中加入 DMSO 到终浓度 1%-8%，按照 1%梯度增加摸索最佳浓度。或者加入甜菜碱至终浓度 1.0-1.7 M。并采用降落 PCR (Touchdown PCR)