

2 × A8 FastHiFi 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

使用说明书

组成	PC8201	PC8202
2 × A8 FastHiFi 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 A8 FastHiFi 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。A8 来自于基因工程改造的 *pfu*，大大提高了扩增速度、保真性和产量。A8 Mix 是非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，可直接用艾德莱 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 2-4kb/min，是 *pfu* 的 4-8 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. 扩增长度指标和 *pfu* 一致，可以完全替代 *pfu* 进行快速高保真扩增，但不建议用于 *pfu* 无法扩增的长片段。

以复杂基因组 DNA 为模板适合扩增不超过 3kb 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 6kb 左右的产物。

建议 PCR 体系设置：

Component	25 µl Reaction	50 µl Reaction	Final Concentration
2× A8 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	15-30 seconds / kb	
Final Extension	72°C	2-5 minutes	
	4-8°C	Hold	

注意事项:

1. A8 扩增速度快，质粒和简单基因组等简单模板可以采用 15-20 秒/kb；复杂模板如人类基因组可以采用 30-45 秒/kb。
2. 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。A8 耐热性强，98°C 对 A8 的活性无改变。
3. 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)

每一批 2 × A8 PCR Mix 出货前必须通过下面的 2 种大小片段的扩增检测:

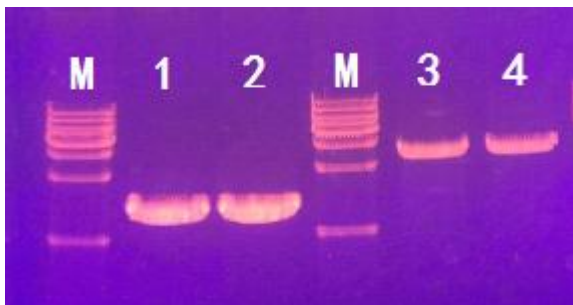


Figure.1. Amplification of DNA fragment from 50 ng genomic DNA in 50 μ l reaction mixture. Lane M: 1kb ladder; Lane 1-2: Poly(A) Polymerase from *E. coli* gDNA, 1.4Kb, extension 20 sec/kb; Lane3-4: H α 1AT from Human gDNA, 2.6Kb, extension 30 sec/kb.