

2× S705 HiFi Master Mix (+Dye)

REF: EG25103-S/M/L

储运条件

-20℃

产品组成

组分	规格 S	规格 M	规格 L
2× S705 HiFi Master Mix (+Dye)	1 ml	5×1 ml	20×1 ml
PCR Enhancer	1 ml	1 ml	5×1 ml

产品简介

2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 是即用型 2× 预混合溶液, 包含 S705 High-Fidelity DNA Polymerase、dNTPs 和精心优化的反应缓冲液, 只需加入模板、引物和水即可进行高保真 PCR 反应。S705 High-Fidelity DNA Polymerase 为定向进化得到的高保真酶, 其保真度是普通 Taq 酶的 70 倍, 扩增速度是 Pfu 的 5 倍。2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 中添加了独特的延伸因子和特异性促进因子, 使其在长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量方面得到了大幅度提升。使用 λDNA、质粒等简单模板时, 2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 可以轻松扩增长达 20 kb 的片段; 而使用基因组 DNA 等复杂模板时, 2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 能有效扩增长达 12 kb 的片段。此外, 2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 对 PCR 抑制剂具有良好的耐受能力, 对粗提样本也能进行很好的扩增。

预混液中包含红色和黄色示踪染料, 可将产物直接用于凝胶电泳。预混液中的红色染料与 1500 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近; 黄色染料与 10 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近。

适用范围

本产品适用于以基因组 DNA、cDNA、质粒以及粗品为模板的 PCR 反应。

使用方法

一、反应体系

试剂	使用量
2× S705 HiFi Master Mix (+Dye)	25 μl
PCR Enhancer (可选)	10 μl ^a
上游引物 (10 μM)	1 μl
下游引物 (10 μM)	1 μl
模板	x μl
ddH ₂ O	Up to 50 μl

a. 当扩增片段 GC 含量 >60% 且优化条件也无法正常扩增时, 推荐使用 PCR Enhancer 来优化 PCR 反应。与无染料的 2× S705 HiFi Master Mix 相比, EG25103 所需的 PCR Enhancer 更少, 请避免加入过量 Enhancer 导致扩增失败。程序推荐: Touchdown PCR (降落 PCR) 程序。

二、推荐的模板用量及反应条件

1. 模板用量:

模板种类	推荐用量
基因组 DNA	10~200 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg~50 ng
cDNA	1~5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)
粗品	1~5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

2. 反应程序:

① 三步法:

步骤	温度	时间
预变性 ^a	95℃	3~5 min
变性	95℃	10 s
退火 ^b	55~72℃	15 s
延伸 ^c	72℃	30 s/kb
终延伸	72℃	5 min

30~35 Cycles

a. 对于普通模板, 预变性可缩短至 30~60 s; 对于复杂模板, 例如高 GC 序列, 推荐延长预变性时间到 3~5 min 以充分变性; 大肠杆菌菌落 PCR: 建议将预变性时间调整 10 min, 无需预裂解即可高效扩增; 酵母菌菌落 PCR: 无需调整预变性时间, 但需要对酵母菌进行预裂解。建议使用以下预裂解方式: 向酵母菌中添加终浓度 20 mM 的 NaOH 后 95℃预裂解 10 min, 或将酵母菌使用液氮反复冻融 2~5 次;

b. 根据引物 Tm 值设置退火温度。如引物 Tm 值 ≥72℃, 可删除退火步骤, 直接进行后续的延伸步骤 (两步法 PCR)。如果需要, 可以建立一个温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外, 退火温度直接决定扩增特异性。如发现扩增特异性差, 可适当提高退火温度;

c. 对于大多数模板, 30 s/kb 即可有效扩增; 对于一些复杂模板, 可延长延伸时间至 30~60 s/kb。

② 两步法^d:

步骤	温度	时间
预变性	95℃	3~5 min
变性	95℃	10 s
退火 & 延伸	65~68℃	30 s/kb
终延伸	72℃	5 min

30~35 Cycles

d. 通常情况下使用两步法和三步法进行 PCR 扩增, 性能无显著差异, 可以根据操作习惯自行选择。但对于一些复杂模板 (如长片段, Tm 分布不均匀, 特殊结构模板), 可以尝试两步法或者 Touchdown PCR (降落 PCR) 法。此外, 使用质粒为模板进行点突变时, 也建议使用两步法。

③ Touchdown PCR (降落 PCR)^e 法:

步骤	温度	时间
预变性	95℃	3~5 min
变性	95℃	10 s
退火	68℃ (-0.2℃ /cycle)	15 s
延伸	72℃	30 s/kb
终延伸	72℃	5 min

30~40 Cycles

e. 该程序仅供参考, Touchdown PCR (降落 PCR) 有多种程序可灵活调整, 请根据实验需求与习惯自行决定是否采用。

注意事项

1. 请不要使用含尿嘧啶的引物和模板。
2. S705 High-Fidelity DNA Polymerase 具有较强的校正活性，产生的扩增产物是平末端，如果用于下一步克隆实验，建议使用平末端克隆。如果扩增产物需要用于 TA 克隆，加 A 之前须先进行 DNA 纯化。
3. 为了提高扩增成功率和产量，请使用高质量的模板。
4. 请设置 PCR 仪程序时选择“Tube”而不是“Block”模式，部分机型两种模式升降温差异较大，“Block”模式可能导致复杂模板扩增失败。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
无产物或产物量少	引物	优化引物设计
	退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度
	引物浓度	适当提高引物浓度
	延伸时间	适当增加延伸时间至 30~60 s/kb
	循环数	增加循环数至 36~40 个循环
	模板纯度	使用高纯度模板
	模板使用量	使用量参照反应体系推荐量调整并适当增加
有杂带或弥散条带	引物	优化引物设计
	退火温度	尝试提高退火温度并设置退火温度梯度
	引物浓度	适当降低引物浓度
	循环数	减少循环数至 25~30 个循环
	模板纯度	使用高纯度模板
	模板使用量	使用量参照反应体系推荐量调整并适当减少