

# ProHiFi DNA 聚合酶

(With Dye) Cat #AP86.27.8P

## 使用说明书

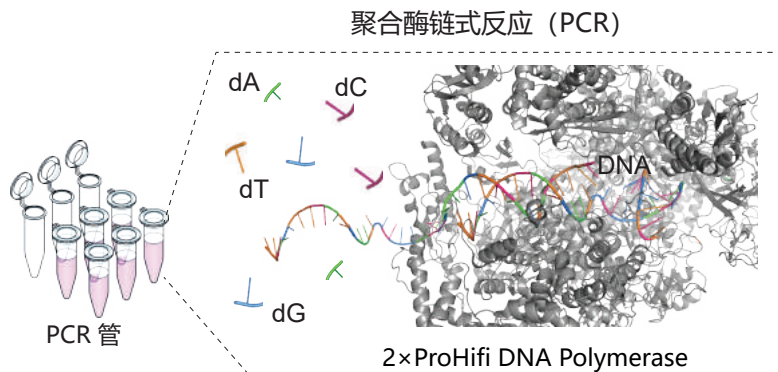


[www.affinibody.com](http://www.affinibody.com)  
Swiss Affinibody LifeScience

---

Version 2.2 V


# 目录 Contents



01 产品概述	.....	02
02 产品品类	.....	02
03 储存条件	.....	02
04 酶活定义	.....	02
05 适用范围	.....	02
06 推荐流程	.....	03
06-1 普通PCR操作流程	.....	03
06-2 点突变操作流程	.....	04
07 性能展示	.....	05
07-1 不同长度片段的扩增展示	.....	05
07-2 不同模板的扩增展示	.....	05
07-3 反复冻融测试	.....	06
08 注意事项	.....	06
09 PCR常见问题及原因解析	.....	07

## 01 产品概述

2×ProHifi DNA Polymerase Master Mix (with dye) 包含2×ProHifi DNA Polymerase、dNTP、染料以及经过极致优化的缓冲液，本品保持了2×ProHifi DNA Polymerase的高保真性及扩增特异性，通过优化的Mix Buffer进一步提高了扩增产量。本产品使用时只需要加入引物和模板即可进行PCR扩增，简化的步骤提高了检测通量及结果的可重现性。本品在体系中添加了独特的保护剂使得2×ProHifi DNA Polymerase Master Mix经过反复冻融仍可保持稳定的活性。此外在极速延伸、高保真的特性下，本品具备优异的反应性能，对PCR反应抑制剂有良好的抵抗能力，在细菌、真菌、血液以及动植物组织裂解液等粗品中均具有优异的扩增性能。本品中已经添加染料，完成PCR后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，无需额外加入上样缓冲液，方便快捷。

 ProHifi DNA Polymerase具有5'→3'DNA聚合酶活性和3'→5'核酸外切酶活性，其扩增产物为平末端。

## 02 产品品类

组分	AP86.28.8P/01	AP86.28.8P/02	AP86.28.8P/05
2×ProHifi DNA Polymerase Master Mix (with dye)	1.25 ml	2 × 1.25 ml	5 × 1.25ml

## 03 储存条件

-25°C ~ -15°C 保存。运输温度：≤0 °C。

 减少反复冻融次数。

## 04 酶活定义

一个活性单位(U)的定义是在74°C的条件下，在30分钟内，以活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，摄入10 nmol全核苷酸所用的酶量。

## 05 适用范围

本产品适用于以基因组DNA、cDNA、质粒DNA或粗品为模板的PCR反应。

\*反应体系兼容Dpn I酶切，PCR完成后可直接加酶进行酶切。

## 06 推荐流程

### 06-1 普通PCR操作流程

#### 反应体系

各组分**完全解冻**后，可参考如下体系加入不同组分，充分混匀后采用Mini离心机将PCR管内液体甩到管底。

组分	25 $\mu$ L 反应体系	50 $\mu$ L 反应体系
2X ProHiFi Maxter Mix (with dye)	12.5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
正向引物 (10 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
反向引物 (10 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
模板 DNA	可变	可变
DMSO (可选)	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
无核酸酶 ddH <sub>2</sub> O	至 25 $\mu$ l	至 50 $\mu$ l

 用完之后样品请及时放回-20 °C 冰箱保存。

#### 模板量的选择

根据不同的PCR扩增类型，推荐使用的模板量如下表所示：

模板 DNA	用量
基因组DNA或cDNA	50-400 ng
质粒	0.01-30 ng

#### 参考扩增程序

参考扩增程序如下，退火温度根据实际引物Tm值浮动。

步骤	温度	时间
初始变性	98 °C	30 seconds
	98 °C	10 seconds
18-35个循环	55-72 °C	10-30 seconds
	72 °C	20-40sec/kb
最终延伸	72 °C	5-10 min
保存	4-8 °C	$\infty$

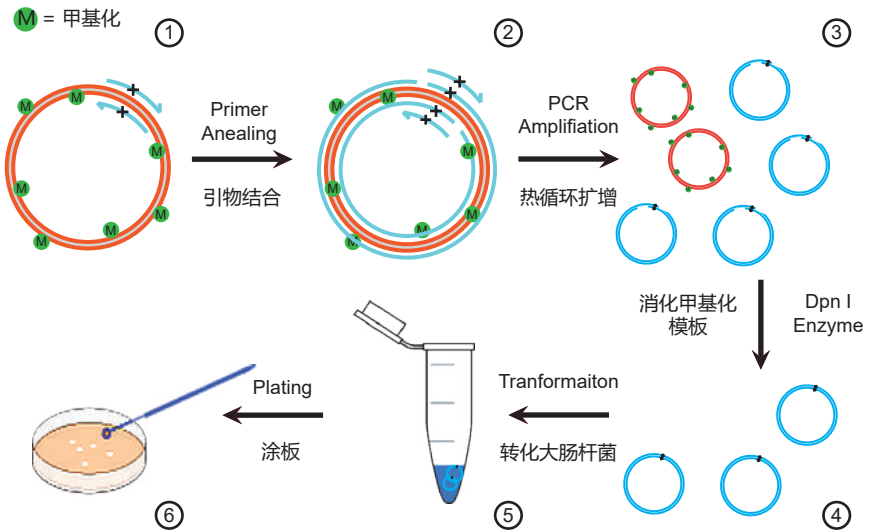
**a.** 初始变性温度98°C设置为30-60s，之后变性时间在98°C 保持10-15s，使得酶活处于最佳状态。退火时间为10-30s。对于简单模板如质粒，延伸时间参照30s/1kb设置，对于cDNA或者复杂基因组模板，延伸时间参照 45s /1kb设置，但请勿超过1min/kb。

**b.**退火温度与引物的T<sub>m</sub>值有关，决定了PCR扩增反应的特异性，如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度，当引物T<sub>m</sub>值超过69°C，建议删除退火步骤使用两步方案，即使引物T<sub>m</sub>>72°C，仍在72°C下进行退火及延伸。

## 06-2 点突变操作流程

### 点突变

体外定点突变技术是一种在生物、医学研究领域常用的实验手段，主要应用于定点改变目的基因，并以此来研究该基因的生物学功能。ProHifi Master Mix在长片段基因及质粒扩增上比同类产品具有明显优势。使用含有突变位点引物PCR扩增环状载体质粒，反应完成后在PCR体系中加入1μl DpnI 酶 37°C 下消化模板质粒。之后取1-2μl 最终产物转化感受态细胞。



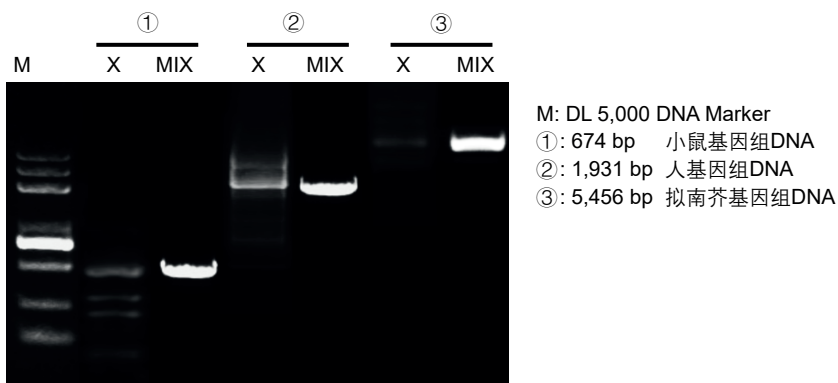
**a.**加入DpnI 酶在37°C 下孵育4h以上能更好地消化模板DNA；

**b.**最终反应产物转化感受态细胞时，加样量一般不超过2μl，过量的反应体系buffer可能抑制并降低感受态细胞转化效率。

## 07 性能展示

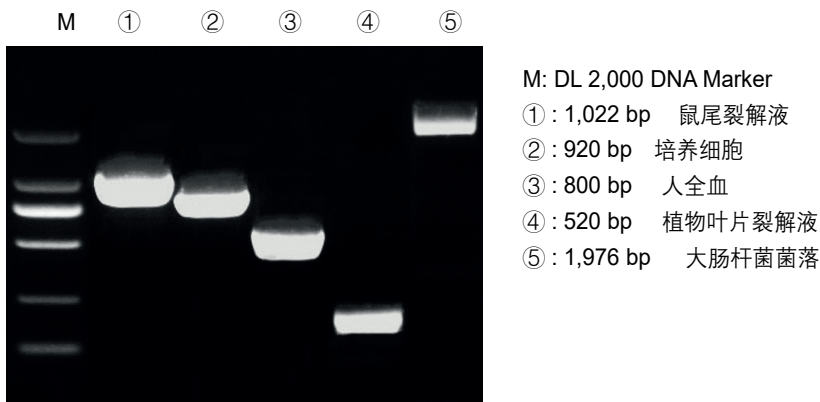
### 07-1 不同长度片段的扩增展示

使用ProHifi Polymerase Master Mix 分别扩增674bp小鼠基因组, 1931bp人基因组, 5456bp拟南芥基因组, 条带清晰展示了高扩增特异性。与市售其他品牌X高保真酶 Master Mix, 按照各自说明书推荐体系和程序扩增, 结果显示ProHifi Polymerase Master Mix 具有显著的扩增特异性。



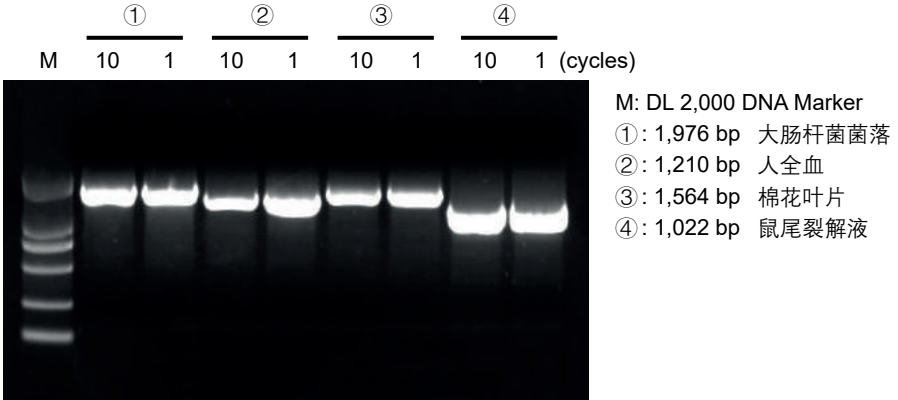
### 07-2 不同模板的扩增展示

使用ProHifi Polymerase Master Mix 在经过极致的优化筛选确立的Buffer体系中扩增不同大小菌落、植物及动物提取物DNA模板, 条带特异清晰, 性能优异。



### 07-3 反复冻融测试

将ProHifi Polymerase Master Mix 经过反复冻融后用于扩增大肠杆菌、人类基因组、棉花及小鼠基因组片段，结果显示反复冻融10次与冻融1次的结果基本相同，表明了ProHifi Polymerase Master Mix 可耐受多次反复冻融的卓越性能。



### 08 注意事项

1. 打开前离心所有管子将所有液体甩到管底，之后充分混匀以确保各个组分的均匀性。

\*长时间存放， $Mg^{2+}$ 可能会根据液形成不同的浓度梯度，因此使用前请充分摇匀；

2. 请使用98°C进行变性。

\*由于反应缓冲液中的盐浓度较高，ProHifi DNA Polymerase在较高的变性和退火温度下性能更优。对于大多数模板，建议初始变性步骤在98°C下进行30s-1min，对于一些复杂的模板（如基因组DNA、cDNA）可能需要较长的初始变性时间，时长可延长到3分钟。之后在PCR循环中的变性步骤时间可以缩短，对于大多数模板来说，在98°C下时长设为10-15秒；

3. 延伸步骤时长建议按照20-50s/kb的速度，不推荐超过1min/kb。

\*延伸在72°C下进行，延伸时间取决于扩增片段的长度和复杂性。对于低复杂性模板(如质粒、λDNA)，建议按照15-30s/1kb的速度计算延伸时间。对于高复杂性模板（如基因组DNA、cDNA模板）建议按照40s/kb的速度计算延伸时间，以获得最佳结果，但请勿超过1min/kb。

4. ProHifi DNA Polymerase产生平末端的DNA产物；
5. 反应体系高度兼容Dpn I，PCR反应之后可直接加酶消化模板；
6. 扩增产物如需要进行TA克隆，在加A之前需要对DNA进行纯化；

\*ProHifi DNA Polymerase具有较强的校对活性，所以残留的聚合酶会降解A突出的部分。

7. 2X ProHifi DNA Polymerase Master mix每种dNTP使用浓度为200 $\mu$ M；请勿使用dUTP以及带有尿嘧啶的引物和模板；

\*ProHifi DNA Polymerase不能读取模板链中的dUTP衍生物或dITP，因此不推荐使用这些含有它们的类似物或引物。

8. 缓冲液中不含有洗涤剂，可适用于微阵列或DHPLC等应用；
9. 2X ProHifi DNA Polymerase Master Mix 对缓冲液做到了极致的优化，兼顾高保真性，长片段扩增以及高GC含量扩增,最终Mg<sup>2+</sup>浓度为2mM；

\*由于ProHifi DNA Polymerase是一种依赖于Mg<sup>2+</sup>的酶，但过量的Mg<sup>2+</sup>可以稳定DNA双链，防止DNA完全变性，引发错误模板位点的假退火降低扩增特异性。反之，Mg<sup>2+</sup>不足也可能导致产物收率降低。最佳Mg<sup>2+</sup>浓度取决于dNTP浓度、特定模板DNA和样品缓冲液组成等，如果引物或模板中含有EDTA或EGTA等螯合剂，则Mg<sup>2+</sup>最佳浓度需要提高，优化时请以0.2 mM的步长增加Mg<sup>2+</sup>浓度。

## 09 PCR常见问题原因解析

### 1. PCR失败无扩增产物

- a. 使用新的高质量的dNTPs（PCR反应体系中dNTPs稳定性最差）建议使用新的dNTP重复实验，同时确保没有加样错误。
- b. 不要使用含dUTP 或者dITP 的dNTPs 和引物。
- c. 模板DNA 可能被损坏。使用谨慎操作纯化的模板。
- d. 降低退火温度。
- e. 在反应体系中加2-8%的DMSO。
- f. 变性温度可能太低，使用98度。
- g. 检查引物的设计纯度和浓度。
- h. 使用GC缓冲液。



## 2. PCR产量少

- a. 增加延伸时间。
- b. 增加循环数。
- c. 增加模板量。
- d. 降低退火温度。

## 3. 产物非特异——呈现高分子量弥散条带

- a. 增加退火温度或者试着使用两步法PCR。
- b. 降低酶浓度并缩短延伸时间，减少总循环数。
- c. 优化镁离子浓度。
- d. 降低引物浓度。

## 4. 产物非特异——呈现低分子量弥散条带

- a. 增加退火温度。
- b. 缩短延伸时间并降低酶浓度。
- c. 优化镁离子浓度。
- d. 降低引物的浓度
- e. 检查引物设计，重新设计引物。



**Swiss Affinibody LifeScience AG**

网址: [www.affinibody.com](http://www.affinibody.com)

邮箱: [info@affinibody.com](mailto:info@affinibody.com)

电话: +41(0)763290285 +86 15902760422

