

FasHiFi Extreme® DNA 聚合酶

(With Dye) Cat #AP86.27.TR

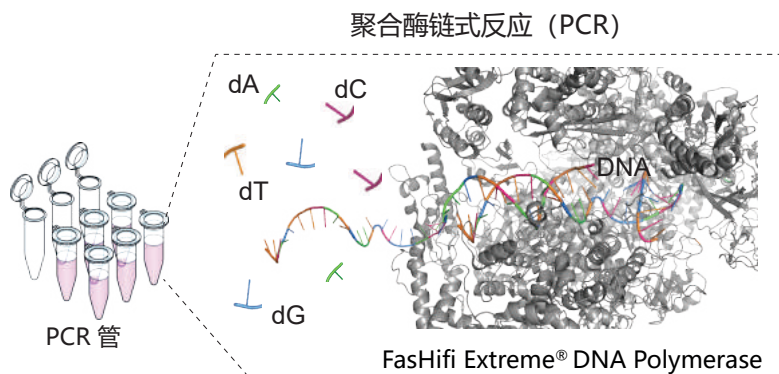
使用说明书



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

2X FasHifi Extreme® DNA Polymerase Master Mix (with dye)包含FasHifi Extreme® DNA Polymerase, dNTP、染料以及极致优化的缓冲体系。其中FasHifi Extreme® DNA Polymerase是经过优化的新一代高保真DNA聚合酶, 扩增效率高, 扩增速度快, 克服了普通聚合酶扩增效率低、产量低和扩增速度慢的缺陷, 极大地缩短了反应时间。配合经过极致优化的缓冲体系, FasHifi Extreme® DNA Polymerase可最大程度的减少非特异扩增和引物二聚体, 带来极高的灵敏度和特异性。FasHifi Extreme® Mix中加入了独特的保护剂, 即使经过反复冻融, 仍可保持酶活的稳定性。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。

 FasHifi Extreme® 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.TF/01	AP86.28.TF/02	AP86.28.TF/05
FasHifi Extreme® 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 μ L 反应体系	50 μ L 反应体系
2X Extreme® Master Mix (with dye)	12.5 μ l	25 μ l
正向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	2.5 μ l
反向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	2.5 μ l
模板 DNA	可变	可变
DMSO (可选)	0.5 μ l	1.0 μ l
无核酸酶 ddH ₂ O	至 25 μ l	至 50 μ 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	∞

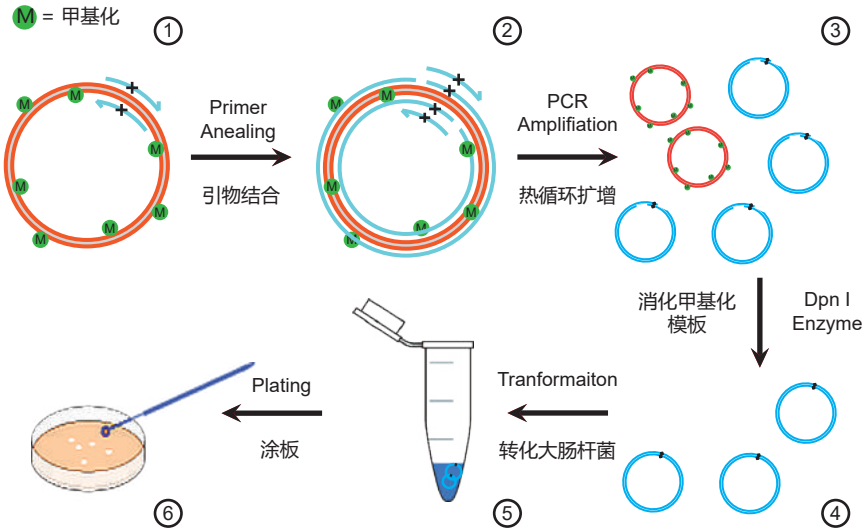
a. 初始变性温度98°C设置为30-60s，之后变性时间在98°C 保持10-15s，使得酶活处于最佳状态。退火时间为10-30s。对于简单模板如质粒，延伸时间参照30s/1kb设置，对于cDNA或者复杂基因组模板，延伸时间参照 45s /1kb设置，但请勿超过1min/kb。

b. 退火温度与引物的Tm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Tm值超过69°C，建议删除退火步骤使用两步方案，即使引物Tm>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。FasHifi Extreme® 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。



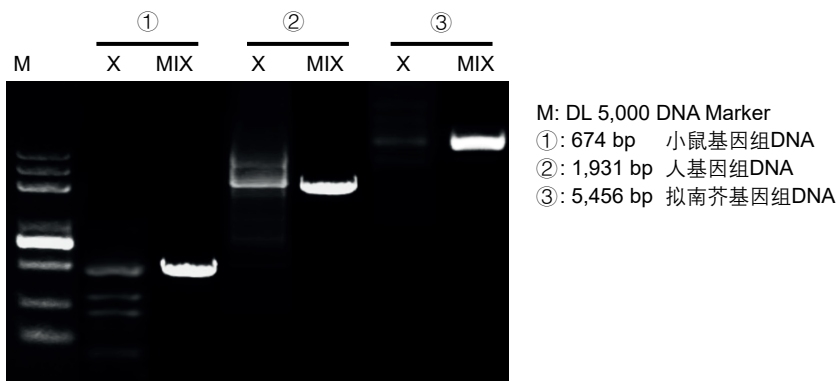
a. 加入DpnI 酶在37°C 下孵育4h以上能更好地消化模板DNA；

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

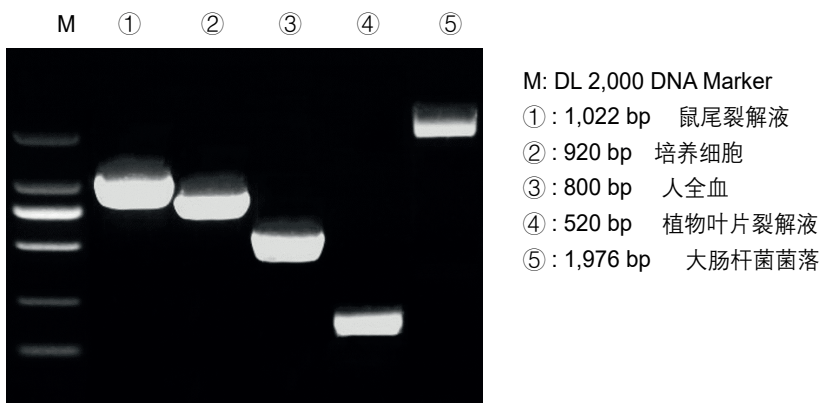
07-1 不同长度片段的扩增展示

使用FasHifi Extreme® 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FasHifi Extreme® Polymerase Master Mix 具有显著的扩增特异性。



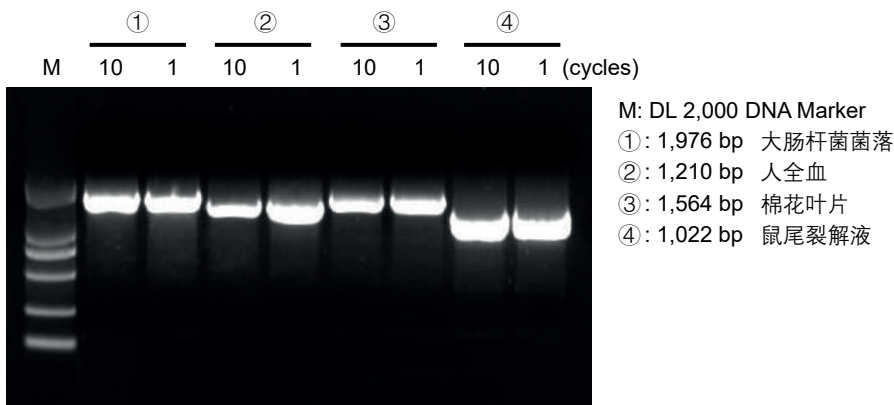
07-2 不同模板的扩增展示

使用FasHifi Extreme® 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FasHifi Extreme® 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FasHifi Extreme® 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，FasHifi Extreme® 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. FasHifi Extreme® 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;

*FasHifi Extreme® 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 FasHifi Extreme® DNA Polymerase Master mix每种dNTP使用浓度为200µM; 请勿使用dUTP以及带有尿嘧啶的引物和模板;

*FasHifi Extreme® 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 FasHifi Extreme® 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Mg²⁺浓度为2mM;

*由于FasHifi Extreme® DNA Polymerase是一种依赖于Mg²⁺的酶, 但过量的Mg²⁺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, Mg²⁺不足也可能导致产物收率降低。最佳Mg²⁺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Mg²⁺最佳浓度需要提高, 优化时请以0.2 mM的步长增加Mg²⁺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

邮箱: info@affinibody.com

电话: +41(0)763290285 +86 15902760422

