

2×F5 FastLong HiFi PCR Mix (with dye) 说明书

组分	KM-F501	KM-F502	KM-F505
2X F5 FastLong HiFi PCR Mix	1 ml	2 × 1 ml	5 × 1ml

产品储存：-20℃保存，有效期 12 个月。

制品说明：2X F5 FastLong HiFi PCR Mix 包含DNA Polymerase、dNTP、蛋白稳定剂以及经过优化的缓冲体系。本产品添加了独特的蛋白稳定剂，使DNA Polymerase的稳定性得到大幅提升，使用时无需置于冰上，常温操作即可。极致优化的缓冲体系保持了DNA Polymerase的高保真性以及扩增特异性，进一步提高了扩增产量。此外，FastLong HiFi PCR Mix对PCR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。

本品中的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。

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。

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 μL 反应体系	50 μL 反应体系
2X F5 FastLong HiFi PCR Mix	12.5 μl	25 μl
正向引物(10 μM)	1.25 μl	2.5 μl
反向引物(10 μM)	1.25 μl	2.5 μl
模板 DNA	可变	可变
DMSO (可选)	0.5 μl	1.0 μl
无核酸酶 ddH ₂ O	至 25 μl	至 50 μl

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T_m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	∞

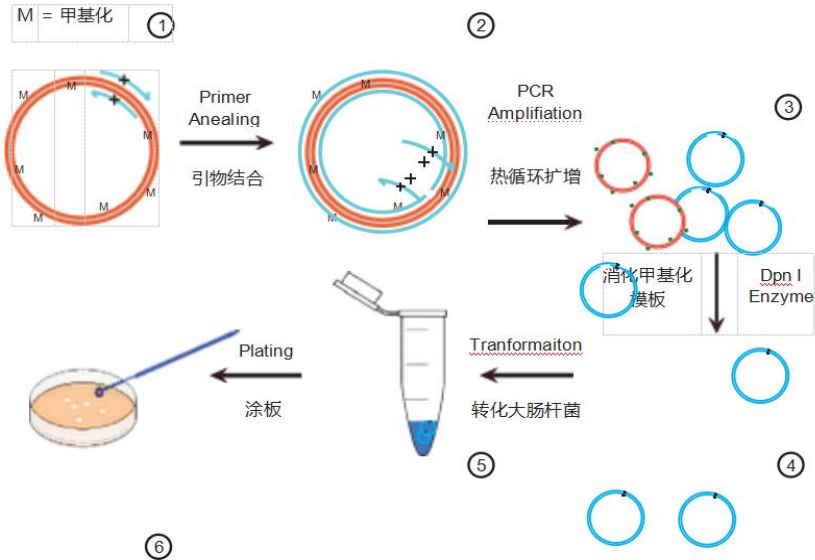
初始变性温度98°C设置为30-60s，之后变性时间在98°C 保持10-15s，使得酶活处于最佳状态。退火时间为10-30s。对于简单模板如质粒，延伸时间参照30s/1kb设置，对于cDNA或者复杂基因组模板，延伸时间参照 45s /1kb设置，但请勿超过1min/kb。

b.退火温度与引物的T_m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_m值超过69°C，建议删除退火步骤使用两步方案，即使引物T_m>72°C，仍在72°C下进行退火及延伸。

点突变操作流程

点突变

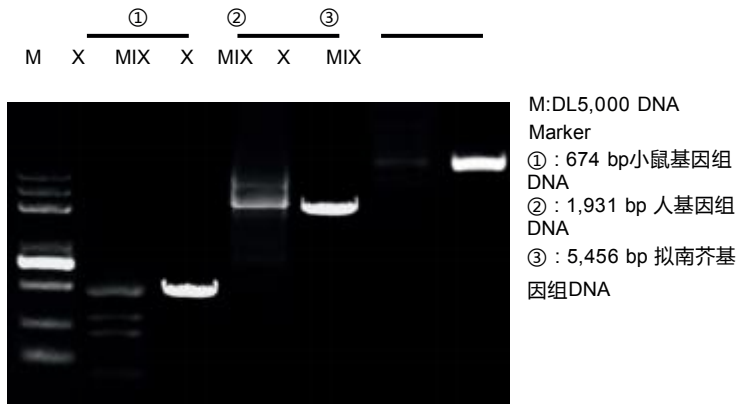
体外定点突变技术是一种在生物、医学研究领域常用的实验手段，主要应用于定点改变目的基因，并以此来研究该基因的生物学功能。2X F5 FastLong HiFi PCR Mix在长片段基因及质粒扩增上比同类产品具有明显优势。使用含有突变位点引物PCR扩增环状载体质粒，反应完成后在PCR体系中加入1μl DpnI 酶 37°C 下消化模板质粒。之后取1-2 μl 最终产物转化感受态细胞。



- 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2 μ l，过量的反应体系buffer可能抑制并 降低感受态细胞转化效率。

不同长度片段的扩展示示

使用FastHiFi PCR 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，结果显示本品具有显著的扩增特异性。



注意事项：

1. 请使用98°C进行变性。由于反应缓冲液中的盐浓度较高，FastHiFi PCR Mix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。
2. 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。
3. 由于FastHiFi PCR Mix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。
4. FastHiFi PCR Mix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；
7. 本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；

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. 在反应体系中加入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. 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