

2×Lab SuperHF PCR Master Mix

货号: T1211

储存条件: -20°C

产品组成:

组分	规格 S	规格 M	规格 L
2× Lab SuperHF PCR Master Mix	1 ml	5×1 ml	20×1 ml
2.5× PCR Enhancer	1 ml	1 ml	5×1 ml

产品简介:

2× Lab SuperHF PCR Master Mix 是即用型 2×预混合溶液, 包含 Lab Super 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。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。

产品特点:

- 保真度高, 扩增速度快:** 保真度是普通 Taq 酶的 70 倍, 扩增速度是 Pfu 的 5 倍。
- 扩增片段长度长:** 使用 λ DNA、质粒等简单模板时, 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, 能有效扩增长达 12 kb 的片段。
- 2× Lab SuperHF PCR Master Mix 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。

反应体系:

试剂	使用量
2× Lab SuperHF PCR Master Mix	25 μ l
2.5× PCR Enhancer (可选)	20 μ l ^a
上游引物 (10 μ M)	1 μ l
下游引物 (10 μ M)	1 μ l
模板	x μ l
ddH ₂ O	Up to 50 μ l

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 μ l (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)
粗品	1~5 μ l (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

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 2.5×PCR Enhancer 来优化 PCR 反应。程序推荐: Touchdown PCR (降落 PCR) 程序。

反应程序:

①三步法:

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^b	95°C	3-5 min	1
变性	95°C	10 s	30-35
退火 ^c	55~72°C	15s	
延伸 ^d	72°C	30 s/ kb	1
终延伸	72°C	5 min	
	4-8°C	Hold	

b. 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;

c. 根据引物 T_m 值设置退火温度。如引物 T_m 值 \geq 72°C, 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;

d. 对于大多数模板, 30s/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^o:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3-5 min	1
变性	95°C	10 s	30-35
退火&延伸	65~68°C	30 s/ kb	
终延伸	72°C	5 min	1
	4-8°C	Hold	

e. 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 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。

③Touchdown PCR (降落 PCR) 法:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3-5 min	1
变性	95°C	10 s	30-40
退火	68°C (-0.2°C/cycle)	15s	
延伸	72°C	30 s/ kb	
终延伸	72°C	5 min	1
	4-8°C	Hold	

f. 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. Lab Super 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。

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

