



2xLab SuperHiFi hotstart mix

货号: T1214

存储条件: -20℃ 保存, 24 个月有效

产品说明

2xLab SuperHiFi hotstart mix 是即用型 2×预混合溶液, 包含 Lab SuperHiFi hotstart 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。Lab SuperHiFi hotstart DNA Polymerase 使用抗体法进行封闭, 室温下酶活被完全抑制, 95℃加热 30 s 即可完全释放活性, 从而减少非特异性扩增。

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。

使用说明

1、反应体系

试剂	使用量
2xLab SuperHiFi hotstart mix a	25 ul
上游引物(10 μM)	1 ul
下游引物(10 μM)	1 ul
模板 DNAC	X ul
ddH ₂ O	up to 50 ul

a.当扩增片段 GC 含量 >60% 且优化条件也无法正常扩增时, 推荐调整 PCR 程序, 程序推荐: Touchdown PCR (降落 PCR) 程序。

模板用量:

基因组 DNA: 10~200 ng

质粒或病毒 DNA: 10 pg~50 ng

cDNA*: 1~20 μl

粗品 1~5 μl : (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

注: 此处推荐量为 LABLEAD 逆转录产物的使用体积, 若使用其他品牌逆转录试剂, 请根据 PCR 结果自行调整 cDNA 体积, 防止其抑制 PCR 扩增。

反应程序 1 (三步法):

步骤	温度	时间	循环
预变性 b	95℃	3~5 min	
变性	95℃	10 s	30~35 Cycles
退火 c	55~72℃	10 s	
延伸 d	72℃	30 s/kb	
终延伸	72℃	5 min	

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; 大肠杆菌菌落 PCR: 建议将预变性调整 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;

c.根据引物 T_m 值设置退火温度。如引物 T_m 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;

d.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。

反应程序 2 (两步法)

步骤	温度	时间	循环
预变性	95℃	3~5 min	
变性	95℃	10 s	30~35 Cycles
退火&延伸	65~68℃	30 s/kb	
终延伸	72℃	5 min	

注: 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, T_m 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。





Touchdown PCR (降落 PCR) 法:

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

注: 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 SuperHiFi hotstart 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。

