

Biomarker HS 2× HF Master Mix

目录: RK02006
规格: 40 RXN
浓度: 2×

◆ 产品介绍

Biomarker HS DNA聚合酶是一种全新的类似*Pyrococcus furiosus*来源的突变酶，具有独特的结构，融合了持续合成增强结构域，提高了保真度和延伸速度，具有高保真性和优异的扩增性能，是分子克隆的理想选择。Biomarker HS DNA聚合酶添加了能够抑制酶活性的单克隆抗体，可进行高特异性的热启动PCR。该酶是具备高保真度的热稳定DNA聚合酶之一。Biomarker HS DNA聚合酶具有5'-3'持续合成活性和3'-5'核酸外切酶活性，其扩增产物为平末端。

热失活: 否
5'-3'外切酶活性: 无
3'-5'外切酶活性: 有
产物末端: 平末端

◆ 产品组成

Biomarker HS 2× HF Master Mix	RM02112
-------------------------------	---------

本产品为Biomarker HS 2× HF Master Mix预混液，其中包含 HiFi DNA聚合酶、dNTPs、反应Buffer、优化的MgCl₂，该预混液中仅需加入DNA模板、引物和水即可进行扩增。该预混液主要针对多样性模板，对如动物、植物、cDNA等均有较好的扩增效率。

保存温度: -20 °C

◆ 操作说明

标准操作:

推荐将所有的反应组分在冰上配制，然后快速将反应体系转移到预热到98 °C的PCR仪中。

所有组分在使用前应混匀并瞬时离心。将其他反应组分混合后，最后加入Biomarker HS 2× HF Master Mix，防止其3'-5'核酸外切酶活性对引物的降解。

注意，Biomarker HS 2× HF Master Mix的操作方法可能与其他聚合酶的标准方法不同。因此，请使用下面推荐的反应条件以获得最佳扩增效果。

◆ 推荐PCR反应:

PCR反应体系:

组份	25 μL	50 μL	终浓度
Biomarker HS 2× HF Master Mix	12.5 μL	25 μL	1×
上游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
下游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
DNA模板*	Variable	Variable	<300 ng
Nuclease-free Water	to 25 μL	to 50 μL	N/A

*不同DNA模板最佳反应浓度不同，可参考PCR基本原则

推荐的PCR反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 °C	45 s	1
变性	98 °C	10 s	25-35
退火	55-65 °C	20~30 s	
延伸	72 °C	10-30 s/kb	
终延伸	72 °C	1-5 min	1
Hold	4-12 °C	∞	1

PCR基本原则:

1.模板:

使用高质量纯化的DNA模板会增加PCR的成功率, 在50 μ L反应体系中推荐加入的DNA模板量如下:

DNA类型	模板量
植物, 动物及人基因组DNA	10 ng-100 ng
<i>E.coli</i> , lambda噬菌体基因组	500 pg-200 ng
质粒DNA	1 pg-10 ng

注意: 如果DNA模板是从cDNA合成反应中获得的, 则添加的体积应小于总反应体积的10%。若扩增长片段, 可适当增加模板投入量。

2.引物:

寡核苷酸引物长度通常是20~40 nt,理想GC含量40~60%。可以使用软件例如Primer 3 设计和分析引物。PCR反应体系中每条引物的终浓度可以在0.1~1 μ M范围内调整, 一般使用0.2 μ M。

3.变性:

98 °C预变性45 s对大多数纯化的DNA模板能充分变性, 对复杂的模板, 例如高GC序列, 可以延长预变性时间到3 min以充分变性。在扩增循环中, 对大多数DNA模板推荐的变性条件是98 °C 5~10 s。

4.退火:

Biomarker HS DNA 聚合酶的退火温度往往高于其他PCR聚合酶。通常, 可以默认退火温度为60 °C; 对大于20 nt的引物, 按(较低引物 T_m +3) °C进行退火10~30 s; 对小于20 nt的引物, 则应采用与较低引物 T_m 相当的退火温度。使用每个新的引物对进行扩增时, 需要通过温度梯度确定优化退火温度。使用两步法进行扩增循环, 温度梯度可以设置为与延伸温度相同。

5.延伸:

推荐延伸温度为72 °C, 延伸时间取决于扩增基因的长度和复杂程度。通常可以按10-30 s/kb速度进行延伸。延伸时间对于简单模板如 *E.coli*, lambda噬菌体基因组在 10 s/kb 左右; 对于较为复杂的模板可以适当延长延伸时间在 20-30 s/kb 左右。对于复杂的扩增子, 如基因组DNA, 建议按 1 min/kb 速度进行延伸。如果需要, 可以降低 cDNA 模板延伸速度到 1 min/kb。

6.循环数:

通常进行25~35个循环可以得到足量的PCR产物。

7.PCR产物:

Biomarker HS DNA聚合酶产生的PCR产物是平末端; 如果下一步进行克隆实验, 建议使用平末端克隆。如果需要进行T/A克隆, 在加A前应先纯化DNA, 因为Biomarker HS DNA聚合酶会将降解产生的dA突出。

两步法推荐反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环
预变性	98 °C	45 s	1
变性	98 °C	10 s	25-35
退火/延伸*	65-72 °C	1 min/kb	
终延伸	65-72 °C	1-5 min	1
Hold	4-12 °C	∞	1

*一般情况下推荐 68 °C,具体可以根据 Tm值改变。

Touchdown 推荐反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 °C	45 s	1
变性	98 °C	10 s	5
延伸	74 °C	10-30s/kb	
变性	98 °C	10 s	5
延伸	72 °C	10-30s/kb	
变性	98 °C	10 s	5
延伸	70 °C	10-30s/kb	
变性	98 °C	10 s	25
延伸	68 °C	10-30s/kb	
终延伸	72 °C	1-5min	1
Hold	4-12 °C	∞	1