

版本号: NG210831

TIANSeq HiFi Amplification Mix

TIANSeq高保真PCR反应预混液

目录号: NG219

产品内容

产品组成	NG219-01	NG219-02	NG219-11	NG219-12
2× HiFi Amplification Mix	1 ml	5×1 ml	1 ml	5×1 ml
Nuclease-Free ddH ₂ O	1 ml	5×1 ml	1 ml	5×1 ml
Loading dye in Mix	Yes	Yes	No	No

保存条件

请将试剂盒置于-30~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq HiFi Amplification Mix是一种新型高保真PCR扩增预混液，适用于高通量测序文库的PCR扩增和其他PCR相关的克隆和检测。

扩增预混液中的Ultra HiFi DNA Polymerase是通过定向分子进化技术开发得到的新型快速高保真DNA聚合酶，增强了DNA聚合酶对模板的亲合力，使得此酶在扩增速度和延伸能力上得到了提升，增加了PCR成功率和产物量。同时，此酶具有优良的3'-5'外切酶活性（Proofreading活性），保真性可达市场上主流产品水平，保证了基因和文库扩增过程中的真实性。此外，本产品中的DNA聚合酶具有热启动（Hot Start）功能，可有效的控制低温情况下的非特异扩增和酶活损耗，进而保证了PCR扩增的特异性和稳定性。

本产品为一管式预混Mix形式，内含热启动型的Ultra HiFi DNA Polymerase、超纯dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液等PCR反应所需组分，只需加入模板和引物即可进行PCR扩增反应，操作简便。除此之外，预混Mix中还整合了PCR反应增强系统，不但提高了预混Mix的稳定性，使得聚合酶对PCR反应抑制剂的耐受能力增强，还提高了Ultra HiFi DNA Polymerase对不同GC含量模板的适应能力，使得本产品具有广泛的样品普适性和模板投入范围，有效降低PCR反应的偏好性。

本产品的PCR产物为平末端，可加A处理再与T载体连接或直接使用平末端克隆载体进行基因克隆，如TIANGEN零背景快速连接试剂盒（目录号：VT205）。

产品特点

扩增快速：延伸速度可达10-15 sec/kb。

延伸力强：可扩增长至15 kb的DNA片段。

特异性好：具有热启动功能，可用于多重PCR。

灵敏度高：模板用量可低至10 pg。

偏好性低：针对不同GC含量的模板都有均衡的扩增效果。

应用广泛：可用于高通量测序文库的PCR扩增和其他PCR相关的克隆和检测。

适用范围

用于DNA的高保真快速扩增，如基因表达克隆、基因定点突变、基因组点突变的分析（SNP）等；更可用于高通量测序中，如高保真基因组DNA文库的富集。

操作步骤

一、高通量测序文库的PCR扩增

注：进行文库扩增实验时，请选用不带Loading dye的NG219-11/NG219-12。

1. 将2×HiFi Amplification Mix、P5/P7 Primers（客户自备）和ddH₂O于室温条件下（15-30℃）融化，混匀，简短离心后于冰盒上备用。

2. 按照下表体系进行PCR反应体系的配制：

组分	50 µl反应体系加入量	反应浓度
2×HiFi Amplification Mix	25 µl	1×
P5 Primer (10 µM)	5 µl	1 µM
P7 Primer (10 µM)	5 µl	1 µM
纯化过的接头连接产物	Variable	< 1 µg
Nuclease-Free ddH ₂ O	To 50 µl	-

注：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。对于多个样品，请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%，以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。

3. 按下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，温度设置于105℃。

步骤	温度	时间	循环数
1	98℃	2 min	1
2	98℃	20 sec	6-12*
3	60℃	30 sec	
4	72℃	30 sec	
5	72℃	1 min	1
6	4℃	Hold	1

*注：请根据DNA的质量和上样量确定PCR循环数。一般而言，对于100 ng、10 ng、1 ng文库起始DNA，在进行PCR富集时分别需要扩增6、10、12个循环。如果在PCR富集之前经过片段大小筛选步骤（size-selection），则建议在原有基础上再增加2-4个循环；如果DNA质量较差（比如提取于FFPE样品），则建议在原有基础上再增加1-3个循环。

4. PCR样品温度降至4℃后，可将PCR产物取出并纯化回收。纯化过程可参考TIANSeq NGS Library Amplification Module (目录号：NG304) 相关步骤。

5. 上机测序前可使用凝胶电泳、qPCR定量或者Agilent生物分析仪对DNA文库质量进行鉴定。纯化后得到的DNA文库可保存于-20℃。

二、常规 PCR扩增

(一)、PCR反应液的配制：

1. 将2×HiFi Amplification Mix、引物、模板和ddH₂O于室温条件下（15-30℃）融化，混匀，简短离心后于冰盒上备用。

2. 按照下表体系进行PCR反应体系的配制：

组分	50 μl反应体系加入量	反应浓度
DNA Template	Variable **	-
Primer F* (10 μM)	1.25 μl	0.25 μM
Primer R* (10 μM)	1.25 μl	0.25 μM
2×HiFi Amplification Mix	25 μl	1×
Nuclease-Free ddH ₂ O	To 50 μl	-

注：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。对于多个样品，请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%，以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。

*引物终浓度为0.25 μM时可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；适当减少PCR反应体系中的引物浓度则可以增加PCR反应特异性。如有必要，可以在0.2-1.0 μM间进行优化选择。

**模板DNA用量请参照如下（50 μl PCR反应体系）：

模板类型	模板用量范围	推荐模板用量
基因组DNA	1-1000 ng	100-500 ng
质粒DNA	0.01-100 ng	1-10 ng
cDNA	1-200 ng	50-100 ng
λ DNA	0.01-100 ng	1-10 ng

3. 按步骤2中建议模板及引物用量加入模板、引物和ddH₂O，混匀后上机进行PCR反应。

(二)、PCR反应条件:

1. 使用2×HiFi Amplification Mix进行扩增反应时, 请先使用三步法。

注: 进行三步法扩增时, 按延伸速度按照10-15 sec/kb进行设定。对于DNA长度≥10 kb的模板或复杂模板, 可将延伸时间延长至30 sec/kb。下述反应程序仅供参考, 实际情况下, 客户可按照自身情况进行更改和调整。

三步法反应程序参考如下:

步骤	温度	时间	循环数
1	94°C	2 min	1
2	98°C	10 sec	35
3	60°C*	30 sec	
4	68°C	10-15 sec/kb	
5	68°C	5 min	1
6	4°C	Hold	1

*退火温度为60°C可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。PCR反应特异性不高时, 可以在55-68°C范围内适当增加退火温度; 如果引物T_m值小于63°C, 可以将退火温度按T_m值进行设定。

2. 当扩增产物出现杂带或弥散时, 请尝试两步法或降落PCR (Step down PCR)。

两步法反应程序参考如下:

步骤	温度	时间	循环数
1	94°C	2 min	1
2	98°C	10 sec	35
3	68°C	10-15 sec/kb	
4	68°C	5 min	
5	4°C	Hold	1

3. 结果检测: 反应结束后取5 μl反应产物, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

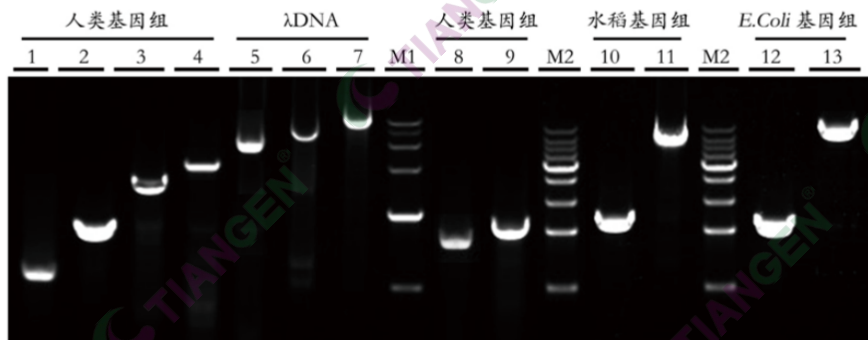
注: 使用NG219-01/NG219-02时, PCR产物可直接进行电泳检测; 使用NG219-11/NG219-12时, 请加入Loading dye (客户自备) 至1×, 混匀后进行电泳检测。

(三)、扩增模板类型及长片段扩增举例：

1. 有记录的样品适用范围和扩增长度如下表所示：

模板类型	有记录的长片段扩增
人基因组DNA	-8 kb
大鼠基因组DNA	-8 kb
水稻基因组DNA	-8 kb
麦基因组DNA	-8 kb
玉米基因组DNA	-8 kb
大肠杆菌基因组DNA	-8 kb
cDNA	-6 kb
λ DNA	-15 kb

2. 具体扩增效果举例：



1: 长度1 kb; 2: 长度2 kb; 3: 长度4 kb; 4: 长度6 kb; 5: 长度8 kb; 6: 长度10 kb; 7: 长度15 kb;
8: 长度1.5 kb (GC含量61.5%) ; 9: 长度1.9 kb (GC含量70.4%) ; 10: 长度2.2 kb; 11: 长度8 kb;
12: 长度2.1 kb; 13: 长度8 kb。

常见问题

出现问题	可能原因	解决办法
无扩增产物 或扩增产物 很少	循环条件不合适	将延伸时间延长至 15-30 sec/ kb
		增加2-5个循环
		使用 Step down PCR（针对 8 kb 以上扩 增片段效果明显）
	模板 DNA 在质 量或数量上不满足要求	增加模板加入量
		减少模板加入量（降低过量模板的抑制作用或者降低不纯净模板中 PCR 抑制物的干扰）
		尽量用经过纯化的模板
		模板中RNA要去干净
	引物问题	引物浓度不适合，当扩增片段较长时尽量选择相对较低的引物浓度（0.2-0.3 μM ）；当模板浓度较低时，尽量选择相对较高的引物浓度（0.3-0.5 μM ）
		尽量使用新配制的引物
		引物设计不合理，重新优化引物
出现杂带或 弥散	循环条件不合适	提升退火温度或尝试两步法
		使用Step down PCR
		减少2-5个循环
	引物降解或设计不合理	重新配制或设计引物（适当的增加引物长度可提高引物和模板间的特异性）
	模板过量	按照说明书中推荐模板用量添加



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品