

产品说明书

产品名称: XK 2×High Fidelity PCR Master mix

产品货号: XKL0203

产品组分

组分	规格
XK 2×High Fidelity PCR Master mix	5×1.0 mL

储存条件

长期保存, 请置于-20°C, 有效期 24 个月。

产品简介

XK High Fidelity DNA 聚合酶是一种高保真的热稳定 DNA 聚合酶, 可用于快速高保真 PCR 扩增。本产品包含高纯度 XK High Fidelity DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应的增强剂、优化剂以及稳定剂, 浓度为 2×。在镁离子存在的条件下, 该酶可催化三磷酸脱氧核苷酸沿 5'→3' 方向发生聚合反应, 合成 DNA。它还具有校正功能的 3'→5' 外切酶活性。XK High Fidelity DNA 聚合酶比普通 Taq 酶扩增效率高、错配率低 (其保真度约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 60 倍以上、Pfu DNA Polymerase 的 6 倍), 同时具有更快的 DNA 合成速度 (15-30sec/kb) 和更强的扩增能力。本产品扩增得到的产物为平末端, 3' 端没有突出的“A”碱基, 胶回收后可与 TOPO-TA 载体 (XKL0602 或者 XKL0606) 连接。

适用范围

- 1) 高保真 PCR 快速扩增
- 2) 复杂模板的 DNA 扩增
- 3) 长距离 PCR
- 4) 血液直接 PCR 扩增

配制体系

组分	20 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
XK 2×High Fidelity PCR Master mix	10 μL	25 μL	1×
10 μM 上游引物	0.5-1 μL	1-2 μL	0.2-0.4 μM
10 μM 下游引物	0.5-1 μL	1-2 μL	0.2-0.4 μM
模板 DNA	见标注*	见标注*	
ddH ₂ O	Up to 20 μL	Up to 50 μL	

1. 低复杂基因组模板 (质粒、病毒、λ 和 BAC DNA 等), 50 μl 体系中添加 5-10 ng。为获得更高保真性的扩增产物, 高浓度模板和少量 PCR 循环数组合是一个较好的方法。

2. 高复杂基因组模板, 50 μl 反应体系中, DNA 模板的使用量应该在 100-500 ng, 如果扩增的片段较长, 最好用琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性。DNA 的完整性越好, 长距离 PCR 的成功率越高。

3. cDNA 模板的添加量不要超过 PCR 反应体系的 1/10, 50 μl PCR 反应体系中 RT 产物的加入量为 2-3 μl, 不要超过 5 μl。



推荐程序

步骤	温度	时间	
预变性	98°C	1 min.	} 25-40 cycles
变性	98°C	5~10 sec.	
退火	50~72°C	10~20 sec.	
延伸	72°C	10~30 sec./1kb	
终延伸	72°C	5 min.	
保存	4°C	∞	

1. XK High Fidelity DNA 聚合酶具有很高的热稳定性，可以用 98°C 预变性，对于大多数模板而言，98°C 预变性 1 min 就足够了，预变性不要超出 3 min。当然也可以按照常规方法使用 94°C 变性 2-5 min。血液直接扩增时，预变性可设置 95°C 10 min，让细胞裂解并释放 DNA。

2. 在循环扩增时，98°C 变性持续时间可以设定 5-10sec，简单模板 5sec，复杂模板 10sec。

3. 一般条件下，可以采用如上表所列的三温度梯度循环的 PCR 扩增方法，引物的退火温度为两条引物中较低 T_m-5 ，引物的退火持续时间可以设定 10-20 sec。当两条引物的 T_m 值都大于等于 70°C 时，而且都使用了长引物，可以使用两步法来扩增，两步法中退火温度和延伸温度都为 72°C。

4. XK High Fidelity DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72°C。延伸所需要的时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒，BAC 这类简单模板，可以使用 15 sec/kb 延伸速度，对于高复杂性的基因组 DNA，可以使用 30sec/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时，延伸时间不要超过 40 sec。

常见问题与解决办法

Q1: 扩增无产物或产物量少?

A1:

- 1) 模板降解或模板纯度差。电泳检测模板质量，使用高质量模板；
- 2) 模板浓度过低。适当增加模板用量；
- 3) 引物不合适。优化引物设计；
- 4) 退火温度不合适。设置退火温度梯度，摸索合适的退火温度；
- 5) 循环数过少。适当增加 5~10 个循环；
- 6) 延伸时间不足。在粗提物做模板或者模板具有复杂序列的情况下，把延伸速度改成 30-60 sec./kb。

Q2: 扩增出现非特异条带或弥散带?

A2:

- 1) 引物特异性差。优化引物，避免非特异性条带以及引物二聚体的扩增；
- 2) 引物浓度过高。降低引物浓度；
- 3) 模板过量或纯度差。减少模板量，使用高质量模板；
- 4) 退火温度过低。适当提高退火温度或使用 Touchdown PCR 程序；
- 5) 循环数过多。减少循环数至 25~30 cycles。

