2× S705 HiFi Master Mix

REF: EG24110-S/M/L

储存条件

-20℃保存 2 年

产品组成

组分	规格 S	规格 M	规格 L
2× S705 HiFi Master Mix	1 ml	5×1 ml	20×1 ml
PCR Enhancer	1 ml	1 ml	5×1 ml

产品简介

2× S705 HiFi Master Mix 是即用型 2× 预混合溶液，包含 S705 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。S705 High-Fidelity DNA Polymerase 为定向进化得到的高保真酶，其保真度是普通 Taq 酶的 70 倍，扩增速度是 Pfu 的 5 倍。2× S705 HiFi Master Mix 中添加了独特的延伸因子和特异性促进因子，使其在长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量方面得到了大幅度提升。使用 λDNA、质粒等简单模板时，2× S705 HiFi Master Mix 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，2× S705 HiFi Master Mix 能有效扩增长达 12 kb 的片段。此外，2× S705 HiFi 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。

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。

使用方法

一、反应体系

试剂	使用量
2× S705 HiFi Master Mix	25 μl
PCR Enhancer（可选）	20 μl[a]
上游引物 (10 μM)	1 μl
下游引物 (10 μM)	1 μl
模板	x μl
ddH_2O	Up to 50 μl

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

二、推荐的模板用量及反应条件

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

2. 反应程序：

① 三步法：

步骤	温度	时间
预变性 [a]	95℃	3~5 min
变性	95℃	10 s
退火 [b]	55~72℃	15 s
延伸 [c]	72℃	30 s/kb
终延伸	72℃	5 min

30~35 Cycles

a. 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；

b. 根据引物 Tm 值设置退火温度。如引物 Tm 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；

c. 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。

② 两步法 [d]：

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

30~35 Cycles

d. 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。

③ Touchdown PCR（降落 PCR）[e] 法：

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

30~40 Cycles

e. 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。

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利
ISO 13485 高新技术企业
愚公生物微信公众号 愚公生物科研小助手 愚公生物微信视频号

注意事项

1. 请不要使用含尿嘧啶的引物和模板。

2. S705 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

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利