# 2× S705 HiFi Master Mix (+Dye)

REF: EG25103-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 (+Dye) | 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 (+Dye) 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 (+Dye) 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 (+Dye) 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 (+Dye) 能有效扩增长达 12 kb 的片段。此外，2× S705 HiFi Master Mix (+Dye) 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。

预混液中包含红色和黄色示踪染料，可将产物直接用于凝胶电泳。预混液中的红色染料与 1500 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近；黄色染料与 10 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近。

## 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 (+Dye) | 25 μl |
| PCR Enhancer（可选） | 10 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。与无染料的 2× S705 HiFi Master Mix 相比，EG25103 所需的 PCR Enhancer 更少，请避免加入过量 Enhancer 导致扩增失败。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。

4. 请设置 PCR 仪程序时选择“Tube”而不是“Block”模式，部分机型两种模式升降温差异较大，“Block”模式可能导致复杂模板扩增失败。

## 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