

2× High-Fidelity PCR Master Mix (With Dye) 2×一代高保真 PCR 预混液（含染料）

产品简介

本品是即用型 2×预混合溶液，包含 High-Fidelity DNA Polymerase，dNTPs 以及优化的缓冲体系。预混液中添加了常温可抑制聚合酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性的两种单克隆抗体，可简便地进行高特异性的 Hot Start PCR。预混液中添加了延伸因子使得该酶具有长片段扩增能力，扩增目的片段的长度可长达 13 kb，该酶具有 5' → 3' DNA 聚合酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性，其保真性是 Taq DNA 聚合酶的 83 倍，是普通 Pfu DNA 聚合酶的 9 倍。适用于复杂模板的扩增，扩增产物为平末端。

本试剂盒具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，反应体系只需加入引物和模板即可，并可以通过两步法的程序进行扩增，简化了实验步骤，节省了时间。本产品中含有电泳指示染料，PCR 产物可直接进行电泳。另外，该产品还含有特异保护剂，使得预混液反复冻融后仍可维持稳定活性。

产品规格

产品货号	N132014S	N132014M	N132014L
产品规格	1 mL	5×1 mL	100×1 mL

组分信息

组分编号	组分名称	N132014S	N132014M	N132014L
N132014	2×High-Fidelity PCR Master Mix (With Dye)	1 mL	5×1 mL	100×1 mL

产品储存

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

操作注意

- 1) 为了您的安全和健康，请穿实验服、佩戴口罩、眼罩、一次性手套等采取防护性措施进行实验操作。
- 2) 本产品仅作科研用途！

操作说明

推荐 PCR 反应体系

表 1 PCR 反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
DNA 模板***	适量	-
Forward Primer (10 μM)**	2 μL	0.4 μM
Reverse Primer (10 μM)**	2 μL	0.4 μM
2×High-Fidelity PCR Master Mix (With Dye)*	25 μL	1×
RNase-free ddH ₂ O	to 50 μL	-

【注】：

- 1) *在终浓度 1×预混液含有 1 U/50 μL 的聚合酶、2 mM Mg²⁺和 200 μM 的 dNTPs。
- 2) ** PCR 反应体系中引物终浓度的范围为 0.2-1 μM，推荐 0.4 μM。
- 3) ***不同模板的推荐使用量 (25 μL 反应体系)：

模板种类	扩增片段 1 kb-10 kb
基因组 DNA	50 ng-200 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg-20 ng
cDNA	1-2.5 μL (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

推荐 PCR 反应程序

- 1) 两步法程序(优先推荐)

表 2 PCR 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	30-35
延伸	68°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

- 2) 三步法程序(常规程序)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性*	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	30-35
退火**	60°C	20 sec	
延伸***	72°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

【注】：

- a. *预变性温度和时间：推荐温度：98°C，时间：3 min，高 GC 含量模板 5-10 min。
- b. **退火温度和时间：推荐温度：60°C，也可根据需要，设立温度梯度去摸索引物退火的最适温度。推荐退火时间设置为 20 sec，可以在 10-30 sec 内调节。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈弥散状。
- c. ***延伸温度和时间：推荐温度：72°C。时间：30 sec/kb，复杂模板根据实际情况可延长至 60 sec/kb。

3) 梯度温度退火程序(难扩增基因推荐程序)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	15, 每个循环降低 1°C
梯度退火	70-55°C	20 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
变性	98°C	10 sec	20
正常退火	55°C	20 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

4) 不同扩增程序下的特点

程序类型	两步法	三步法	梯度退火
速度	最快	中等	慢
特异性	高	中等	高
PCR 产量	中等	最高	中等
检出率	高	中等	高