

2×High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)

2×高保真长片段快速 PCR 预混液（含染料）

产品简介

2×High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)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，预混液中含有预先添加的电泳指示剂，PCR 产物可直接进行电泳，扩增产物为平末端，延伸速度为 10 sec/kb。其保真性是 Taq DNA 聚合酶的 83 倍，是普通 Pfu DNA 聚合酶的 9 倍，适用于复杂模板扩增。2×High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)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。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。

产品信息

货号	N132017E	N132017S	N132017M
规格	250 μL	1 mL	5×1 mL

储存条件

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 冰上融化试剂，混匀后备用。
2. 冰上配制表 1 中的 PCR 扩增反应液。配制完成后充分混匀离心。
3. 若模板为粗提样本，建议添加体积不超过反应体系的 5%。

表 1. PCR 扩增反应体系

组分	体积 (μL)
模板 (10~200ng)	x
正向引物 (10 μM)*	2
反向引物 (10 μM)*	2
2×High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)	25
ddH ₂ O	Up to 50

*PCR 反应体系中引物终浓度范围 $0.4 \sim 1 \mu\text{M}$ ，引物终浓度过低，会影响扩增效果，若扩增效果不理想，可适当提高引物添加量，提升检出率。

4. 将 PCR 管转移到 PCR 仪根据表 2 进行片段扩增。

5. 推荐 PCR 扩增程序

表 2. PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98° C	30 sec	1
98° C	10 sec	30-35（根据实验要求）
60° C*	5 sec	
68° C~72° C**	5~10 sec/kb	
72° C	2 min	1
4° C	Hold	-

*退火温度推荐 60° C，也可根据需要，设立温度梯度摸索引物退火的最适温度。推荐退火时间为 5 sec，可以在 5-20 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。

**延伸温度和时间：10 kb 以上长片段或较高 GC 片段扩增，推荐使用 68° C，10 kb 及 10 kb 以下片段且 gc 在 40%~60% 的片段扩增，可以尝试 72° C 延伸。当扩增效果不理想时，延伸速率根据实际结果可在 5 sec/kb~10 sec/kb 之间进行调整，扩增片段 < 10 kb 时，延伸速率可选择 5 sec/kb，当扩增片段 ≥ 10 kb 时，延伸速率可选 10 sec/kb。

6. 吸取 5~8 μL 扩增产物，用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，检测是否扩增出正确条带。

应用示例

1. Overlap PCR

1) 扩增子1、扩增子2制备

表3. PCR反应体系配制（50 μL 体系）

组分	使用量
2×High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)	25 μL
模板 1 DNA、模板 2 DNA	10~100 ng
一轮引物 F1 (10 μM)、一轮引物 F2 (10 μM)	2 μL
一轮引物 R1 (10 μM)、一轮引物 R2 (10 μM)	2 μL
ddH2O	To 50 μL

表4. 一轮PCR程序

温度	时间	循环数
98° C	30 sec	1
98° C	10 sec	30-35 (根据实验要求)
60° C	5 sec	
72° C	10 sec/kb	
72° C	2 min	1
4° C	Hold	-

2) Overlap PCR (两扩增子融合)

表5. 二轮PCR反应体系配制 (50 μ L体系)

组分	使用量
2 $\times$ High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)	25 μ L
一轮扩增产物 1 (扩增子 1)	2~4 μ L
一轮扩增产物 1 (扩增子 2)	2 μ L
一轮引物 F1 (10 μ M)	2 μ L
一轮引物 R2 (10 μ M)	2 μ L
ddH ₂ O	To 50 μ L

表6. 二轮PCR程序设置 (与一轮程序相同)

温度	时间	循环数
98° C	30 sec	1
98° C	10 sec	30-35 (根据实验要求)
60° C	5 sec	
72° C	10 sec/kb	
72° C	2 min	1
4° C	Hold	-

【注】若 Overlap 产物杂带较多，可以考虑将一轮扩增产物 (扩增子 1、扩增子 2) 纯化后，再做二轮扩增。

2. 质粒扩增

表7. PCR 反应体系配制 (50 μ L体系)

组分	使用量
2 $\times$ High-Fidelity Long PCR Master Mix (With Dye)	25 μ L
pCambia2301	10~100 ng
正向引物 F (10 μ M)	2 μ L
反向引物 R (10 μ M)	2 μ L
ddH ₂ O	To 50 μ L

表8. PCR程序设置

温度	时间	循环数
98° C	3 min	1
98° C	10 sec*	30-40（根据实验要求）
60° C**	5 sec	
72° C***	10 sec/kb	
72° C	2 min	1
4° C	Hold	—

*若质粒为结构紧密的超螺旋，可以适当延长变性时间。

**退火温度推荐使用 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，当产量低时可下调退火温度，当产物特异性差时，则上调退火温度。推荐退火时间为 5 sec，可以在 5-20 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。

***延伸温度和时间：10 kb 以上长片段或较高 GC 片段扩增，推荐使用 68° C，10 kb 及 10 kb 以下片段且 gc 在 40%~60%的片段扩增，可以尝试 72° C 延伸。当扩增效果不理想时，延伸速率根据实际结果可在 5 sec/kb~10 sec/kb 之间进行调整，扩增片段 <10 kb 时，延伸时间可选 5 sec，当扩增片段 ≥10 kb 时，延伸速率可选 10 sec/kb。