

## 常见问题与解决方案

| 常见问题     | 解决方案  |
|----------|---|
| 无产物或产物量少 | <p>引物：优化引物设计。</p> <p>退火温度：设置退火温度梯度，找到合适的退火温度。</p> <p>引物浓度：适当提高引物浓度。</p> <p>延伸时间：适当增加延伸时间至 30 sec/kb - 1 min/kb。</p> <p>循环数：增加循环数至 36 - 40 个循环。</p> <p>模板纯度：使用高纯度模板。</p> <p>模板使用量：使用量参照反应体系推荐量调整并适当增加。</p> |
| 有杂带或弥散条带 | <p>引物：优化引物设计。</p> <p>退火温度：尝试提高退火温度并设置退火温度梯度。</p> <p>引物浓度：适当降低引物浓度。</p> <p>循环数：减少循环数至 25 - 30 个循环。</p> <p>反应程序：使用两步法或 Touch down PCR 程序。</p> <p>模板纯度：使用高纯度模板。</p> <p>模板使用量：使用量参照反应体系推荐量调整并适当减少。</p>        |

## HRK Super pfu Master Mix

### 使用说明书

#### 【目录号】

HRK-202401 (1ml)

HRK-202402 (5ml)

#### 【产品内容】

| 试剂成分                         | 规格  |     |
|------------------------------|-----|-----|
| 2 × HRK Super pfu Master Mix | 1ml | 5ml |

#### 【产品简介】

HRK Super pfu DNA Polymerase 是一种经过蛋白工程设计而获得的一种新型的 DNA 聚合酶。该酶具有 3' → 5' 核酸外切酶活性，可以修复 PCR 扩增中产生的错配碱基，因此比普通的 taq DNA 聚合酶的保真性高 100 倍以上。该酶提高了对 DNA 的结合能力，不仅扩增速度比普通的 pfu 酶快，而且还适用于长片段扩增，最大有效扩增长度可达 20Kb。同时该酶比 taq 酶的热稳定性好，95℃ 1 小时仍保持 90% 以上的活性，对于 GC 含量高的模板，变性温度可以提高到 98℃ 而不影响酶活，配合优化后的 buffer 更有利于高 GC 的 PCR 扩增。

本产品包含 HRK Super pfu DNA Polymerase、dNTPs 以及优化的缓冲体系，只需加入引物和模板即可进行扩增，实验操作简便，结果重复性和稳定性好。体系中加入的保护剂使得 2 × HRK Super pfu Master Mix 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。

本产品扩增产物为平末端，可适用于平末端克隆、限制性内切酶克隆或者无缝克隆。

#### 【产品特点】

- 保真度高：保真度是 Taq DNA Polymerase 的 128 倍；
- 扩增更快：20 sec/kb 可高效扩增绝大多数片段；
- 扩增更长：质粒、λ DNA 等简单模板有效扩增长度可达 20 kb，基因组有效扩增长度可达 5 kb，cDNA 有效扩增长度可达 8 kb；
- 适应度广：GC 含量兼容范围 24-80%；
- 操作便捷：加入引物和模板即可进行扩增；

## 【储存条件及有效期】

- 存储温度：-30~-15℃保存，≤0℃运输
- 在正确储存条件下，试剂盒有效期为 12 个月。

## 【适用范围】

本产品适用于以基因组 DNA、cDNA、质粒以及全血等为模板的 PCR 反应。

## 实验流程

### 1、反应体系

所有操作请在冰上进行，PCR 相关组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回 -20℃ 保存

| 组分  | 50ul 反应体系 <sup>1, 2</sup> | 终浓度         |
|---|---------------------------|-------------|
| DNA Template <sup>4</sup>                 | As required               | As required |
| 2 × HRK Super pfu Master Mix <sup>3</sup> | 25 μl                     | 1x          |
| Primer F(10 μM)                           | 1.5μl                     | 0.3μM       |
| Primer R(10 μM)                           | 1.5μL                     | 0.3μM       |
| ddH <sub>2</sub> O                        | UP to 50μL                | N/A         |

<sup>1</sup> 反应体积可以在 10-50 μl 范围调整，其他组分等比例调整，不建议反应体积超过 50 μl。

<sup>2</sup> 如果用于文库扩增，请根据文库构建试剂盒使用说明进行调整。

<sup>3</sup> 2 × HRK Super pfu Master Mix 含有 2mM MgSO<sub>4</sub>，可根据需要额外加入。

<sup>4</sup> 不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为 50 μl 体系推荐模板使用量。

| 模板种类      | 模板使用量                          |
|-----------|--------------------------------|
| 基因组 DNA   | 50-400ng                       |
| 质粒或病毒 DNA | 10pg-30ng                      |
| cDNA      | 1 - 5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10) |

### 2、反应程序<sup>1</sup>：

| 循环步骤             | 温度       | 时间           | 循环数            |
|------------------|----------|--------------|----------------|
| 预变性 <sup>2</sup> | 98℃      | 3min         | 25 - 35 cycles |
| 变性               | 98℃      | 15 sec       |                |
| 退火 <sup>3</sup>  | 56 ~ 72℃ | 20 sec       |                |
| 延伸 <sup>4</sup>  | 72℃      | 10-30 sec/Kb |                |
| 彻底延伸             | 72℃      | 5 min        |                |

1. 如果使用二代测序文库扩增,请使用文库扩增试剂盒提供的程序。
2. 预变性 98℃ 3min 满足大部分的 PCR 扩增。使用 98℃ 5min 进行高 GC(>70%)的目标片段扩增。
3. 一般推荐 60℃的退火温度。如果 60℃退火扩增效果不佳，请根据引物 T<sub>m</sub> 值设置退火温度。如引物 T<sub>m</sub> 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。
4. 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高。若扩增片段 ≥ 1Kb，延伸时间建议 30 sec/Kb。

## 【注意事项】

1. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。
2. 请使用高质量的模板。
3. 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物和模板。
4. HRK HiFi DNA Polymerase 具有较强的校对活性。因此，如扩增产物需要进行 TA 克隆，加 A 之前必须进行 DNA 纯化。
5. 引物设计：
  - a. 引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
  - b. 引物 3'端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；
  - c. 引物 3'端应避免出现发夹结构；
  - d. 正向引物和反向引物的 T<sub>m</sub> 值相差不超过 1℃为佳，T<sub>m</sub> 值调整至 55 ~ 65℃为佳(引物 T<sub>m</sub> 值推荐使用 Primer Premier 5 进行计算)；
  - e. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 T<sub>m</sub> 值计算；
  - f. 引物的 GC 含量控制在 40% - 60%之间；
  - g. 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域；
  - h. 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3'端避免有 3 个碱基以上的互补序列；
  - i. 引物设计完毕请使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。