

版本号: KP221125

## Ultra HiFidelity PCR Kit II

### 超强高保真PCR试剂盒 II

目录号: KP213

#### 产品内容

产品组成	KP213-01	KP213-02	KP213-03
2×UltraHiFi Mix II	1 ml	5×1 ml	3×5×1 ml
PCR Enhancer	500 μl	500 μl	3×500 μl
6×DNA Loading Buffer (Blue)	1 ml	2×1 ml	3×2×1 ml
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	5 ml	3×5 ml

#### 储存条件

请将试剂盒置于-30~-15°C保存, 避免反复冻融。保质期为一年。

---

## 产品简介

Ultra HiFidelity PCR Kit II 是一种新型高保真PCR扩增预混液。适用于PCR相关的克隆和检测。

扩增预混液中的Ultra HiFi DNA Polymerase II 是通过定向分子进化技术开发得到的新型超强高保真DNA聚合酶，相比于Ultra HiFi DNA Polymerase，它有更强的3'-5'外切酶活性（Proofreading活性），提高了DNA扩增过程中的真实性；同时，增强了该酶对模板的亲合力，提升了酶的灵敏度和延伸能力。上述两方面的改良，使得新酶在PCR扩增成功率和长片段扩增方面得到了加强，从而提高了本产品的扩增和后续克隆的效率。此外，本产品中的DNA聚合酶具有热启动（Hot Start）功能，可有效的控制低温情况下的非特异扩增和酶活损耗，进而保证了PCR扩增的特异性和稳定性。

本产品为一管式预混Mix形式，内含热启动型的Ultra HiFi DNA Polymerase II、超纯dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液等PCR反应所需组分，实验时，只需加入模板和引物即可进行PCR扩增反应，操作简便。除此之外，本产品中还整合了PCR Enhancer组分，可以提高Ultra HiFidelity PCR Kit II 对PCR反应抑制剂的耐受能力和对不同GC含量模板的适应能力，因此可以在扩增高级结构复杂的产物和PCR抑制剂含量较高的PCR体系时添加使用。

本产品的PCR产物为平末端，可直接使用平末端克隆载体（如TIANGEN零背景快速连接试剂盒-VT205/VT206）或者无缝克隆技术（如TIANGEN EasyGeno快速重组克隆试剂盒-VI201/VI202）进行基因克隆。

## 产品特点

**高保真性：**为Taq聚合酶的180倍。

**模板普适性：**能够识别GC含量30%~80%的不同物种DNA片段。

**延伸力强：**可扩增长至20 kb的DNA片段。

**高灵敏度：**基因组模板用量可低至1 ng。

**操作简便：**只需加入模板和引物，轻松配好体系，PCR产物平末端，纯化后可直接用于无缝克隆。

## 适用范围

用于DNA的高保真扩增，如基因表达克隆、基因定点突变、基因组点突变的分析（SNP）等。

## 一、PCR反应液的配制：

1. 将2×UltraHiFi Mix II、PCR Enhancer、引物、模板和ddH<sub>2</sub>O于室温条件下（15-30℃）融化，混匀，简短离心后于冰盒上备用。

**注意：2×UltraHiFi Mix II有时会出现沉淀，一定要充分溶解后再行使用。**

2. 按照下表体系进行PCR反应体系的配制：

组分	50 μl反应体系加入量	反应浓度
DNA Template	Variable **	-
Primer F* (10 μM)	2.5 μl	0.5 μM
Primer R* (10 μM)	2.5 μl	0.5 μM
2×UltraHiFi Mix II	25 μl	1×
ddH <sub>2</sub> O	To 50 μl	-

**注意：1. 试剂盒中赠送了PCR Enhancer (5×)，在一般PCR反应中无需添加，当扩增区域含有复杂的高级结构或者GC含量超过65%时，可以在PCR体系中添加PCR Enhancer (反应浓度设置在0~1×之间，即50 μl体系中添加0~10 μl PCR Enhancer)。**

**2. 配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上操作。对于多个样品，请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%，以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。**

\* 引物终浓度为0.5 μM时可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；适当减少PCR反应体系中的引物浓度则可以增加PCR反应特异性。如有必要，可以在0.2-1.0 μM间进行优化选择。

\*\* 模板DNA用量请参照如下（50 μl PCR反应体系）：

模板类型	模板用量范围	推荐模板用量
基因组DNA	1-1000 ng	100-500 ng
质粒DNA	0.01-100 ng	0.1-10 ng
cDNA	1-200 ng	50-100 ng
λ DNA	0.01-100 ng	1-10 ng

3. 配好体系后，混匀上机进行PCR反应。

## 二、PCR反应条件：

1. 使用2×UltraHiFi Mix II 进行扩增反应时，可选三步法或者降落PCR（Step down PCR）程序。对于已知最优退火温度的引物体系，可选用三步法程序。对于未知最优退火温度的引物体系，可以通过设置温度梯度进行三步法扩增以找到最优退火温度，也可以尝试直接采用降落PCR程序进行扩增。

三步法反应程序参考如下：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98℃	30 sec	1
变性	98℃	10 sec	35
退火	x℃*	20 sec	
延伸	72℃	30 sec/kb**	
彻底延伸	72℃	5 min	1

降落PCR反应程序参考如下：

步骤	温度	时间	温度变化	循环数
预变性	98℃	30 sec	—	1
变性	98℃	10 sec	—	10
退火	67℃	20 sec	-0.5℃/cycle	
延伸	72℃	30 sec/kb**	—	
变性	98℃	10 sec	—	25
退火	62℃	20 sec	—	
延伸	72℃	30 sec/kb**	—	
彻底延伸	72℃	5 min	—	1

\* 退火温度为60℃时可以在大多数体系中获得良好扩增结果，对于扩增效果不好的体系，可以在55~72℃范围内设置退火温度梯度，从而寻找最优退火温度。

\*\* 进行目标DNA片段扩增时，对于6 kb以下的片段扩增，建议延伸速度按照30 sec/kb设定，对于大于6 kb的片段扩增，建议延伸速度调整为40~50 sec/kb。

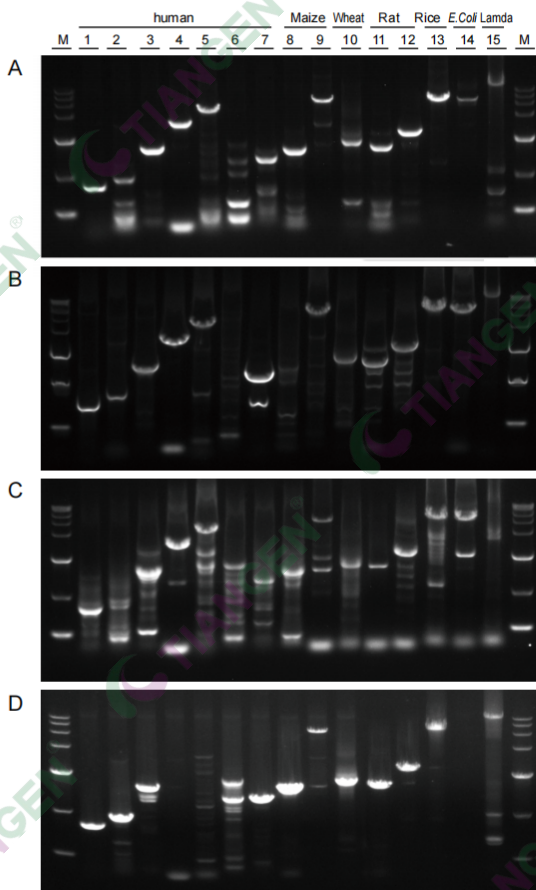
**注意：**以上反应程序仅供参考，实际情况下，客户可按照自身情况进行更改和调整。

2. 结果检测：反应结束后取5 μl反应产物，混合6×DNA Loading Buffer (Blue)后，进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 三、实验例：

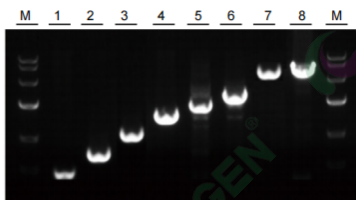
#### 1. 以不同物种基因组为模板扩增：

使用Ultra HiFi DNA Polymerase II (A)、国外TY公司(B) 和K公司(C) 高保真酶、国内T公司(D) 高保真酶分别扩增不同来源、不同长度的片段。结果显示，Ultra HiFi DNA Polymerase II 在扩增能力、特异性、普适性、长片段扩增效率方面的综合性能表现优秀。



## 2. 高低GC模板适应性:

使用Ultra HiFi DNA Polymerase II 分别扩增 GC含量低(30%~35%)和高(65%~79%)的基因序列, 都得到了特异的扩增产物, 说明该酶对高低GC模板具有广泛的兼容性。

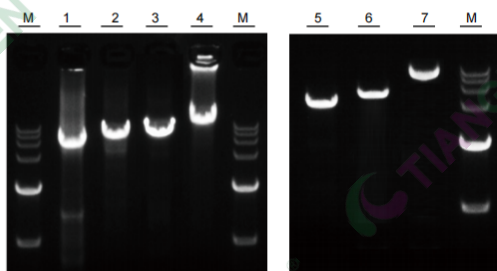


M: TIANGEN DNA Marker IV.

1: 0.4 kb, GC 75%; 2: 0.7 kb, GC 30%; 3: 1.1 kb, GC 79%;  
4: 1.5 kb, GC 71%; 5: 1.9 kb, GC 72%; 6: 2.4 kb, GC 35%;  
7: 3.9 kb, GC 70%; 8: 4.1 kb, GC 65%。

## 3. 大片段扩增:

普通的高保真DNA聚合酶对大片段扩增存在一定困难, 而Ultra HiFi DNA Polymerase II 对大片段具有优秀的扩增能力。

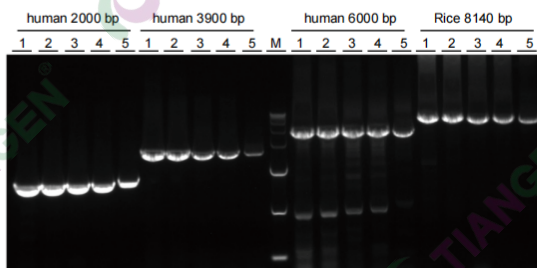


M: TIANGEN D15000 Marker.

1-4: 模板为水稻基因组DNA;  
5-7: 模板为水稻cDNA。  
1: 8.3 kb; 2: 13.3 kb; 3: 13.9 kb;  
4: 16.5 kb; 5: 5.3 kb;  
6: 6.5 kb; 7: 12.9 kb。

## 4. 灵敏度:

Ultra HiFi DNA Polymerase II 以人类或者水稻基因组不同浓度DNA为模板分别扩增不同的基因片段, 低至1 ng的模板扩增产物清晰可见。



M: TIANGEN D15000 Marker.

1: 模板量200 ng; 2:模板量100 ng; 3:  
模板量10 ng; 4:模板量5 ng; 5:模板量  
1 ng。



## 常见问题

出现问题	可能原因	解决办法
无扩增产物或 扩增产物很少	循环条件不合适	将延伸时间延长至30-45 sec/kb
		增加2-5个循环
		使用Step down PCR（针对8 kb以上扩增片段效果明显）
		设置退火温度梯度，筛选最优引物退火温度
	模板DNA在质量或数量上不满足要求	增加模板加入量
		减少模板加入量（降低过量模板的抑制作用或者降低不纯净模板中PCR抑制物的干扰）
		尽量用经过纯化的模板
		模板中RNA要去除干净
	引物问题	引物浓度不适合，当扩增片段较长时尽量选择相对较低的引物浓度（0.2-0.3 $\mu\text{M}$ ）；当模板浓度较低时，尽量选择相对较高的引物浓度（0.3-0.5 $\mu\text{M}$ ）
		尽量使用新配制的引物
		引物设计不合理，重新优化引物
	出现杂带或弥散	循环条件不合适
使用Step down PCR		
减少2-5个循环		
引物降解或设计不合理		设置退火温度梯度，筛选最优引物退火温度
		重新配制或设计引物（适当的增加引物长度可提高引物和模板间的特异性）
模板过量		按照说明书中推荐模板用量添加



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

# 浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品