

## YALEPIC<sup>®</sup> Noalign Flash HiFi MasterMix

**产品货号:** YEM51006-A; YEM51006-B

**产品保存及运输条件:** -20°C 保存, < 0°C 运输

### 产品概述

YALEPIC<sup>®</sup> Noalign Flash HiFi MasterMix 包含了通过基因改造技术实现快速扩增的热启动高保真 DNA 聚合酶、dNTPs 和优化的 PCR 扩增反应缓冲液, 扩增时只需加入模板、引物和水。该产品具有 PCR 抑制物耐受性高、模板兼容性强、延伸速度快、扩增特异性高、扩增效率高等特点, 3kb 以内片段延伸速度可达 1 sec/kb, 10kb 以内片段可达 5 sec/kb 延伸速度。该产品具有 5'→3' DNA 聚合酶活性和 3'→5' 核酸外切酶活性, 扩增产物为平末端, 其保真度是普通 Taq 酶的 108 倍, 可高效扩增 15 kb 以内的基因组片段及 20 kb 以内的质粒 DNA。

### 产品组分

| 序号 | 产品组分                                                          | 规格       |
|----|---------------------------------------------------------------|----------|
| ①  | 2 × YALEPIC <sup>®</sup> Noalign Flash HiFi MasterMix / (Dye) | 5 × 1 ml |
| ②  | Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O                              | 5 ml     |

### 适用范围

本产品广泛适用于 PCR 扩增反应。

## 实验流程

### 1. 配制反应液:

| 组分                                                                    | 25 $\mu$ l 体系    | 50 $\mu$ l 体系    |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Template DNA                                                          | x $\mu$ l        | x $\mu$ l        |
| Primer F (10 $\mu$ M)                                                 | 0.5~1 $\mu$ l    | 1~2 $\mu$ l      |
| Primer R (10 $\mu$ M)                                                 | 0.5~1 $\mu$ l    | 1~2 $\mu$ l      |
| 2 $\times$ YALEPIC <sup>®</sup> Novalign Flash HiFi MasterMix / (Dye) | 12.5 $\mu$ l     | 25 $\mu$ l       |
| ddH <sub>2</sub> O                                                    | Up to 25 $\mu$ l | Up to 50 $\mu$ l |

#### 注:

- 以 50  $\mu$ l 体系为例, 推荐使用的模板量如下: 动植物基因组 DNA: 0.1~1  $\mu$ g; 大肠杆菌基因组 DNA: 10~100 ng; 质粒 DNA: 0.1~10 ng;  $\lambda$ DNA: 0.5~10 ng; cDNA: 1~5  $\mu$ l。cDNA 模板加入体积不宜超过 PCR 反应总体积的 1/10。
- 请将所有组分于冰上充分化冻后配制 PCR 反应液, 并及时将剩余组分放回 -20°C 保存。

### 2. PCR 反应程序推荐:

|      |              |              |     |
|------|--------------|--------------|-----|
| 98°C | 30 sec~3 min | 1 cycle      | 预变性 |
| 98°C | 10 sec       | 30~35 cycles | 变性  |
| X°C  | 10 sec       |              | 退火  |
| 72°C | 1-10 sec/kb  |              | 延伸  |
| 72°C | 5 min        | 1 cycle      | 延伸  |

#### 注:

- 质粒 DNA、简单基因组 DNA 等模板的预变性时间可设置为 30 sec~1 min, 如果为具有复杂二级结构高 GC 区域, 可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果。
- 循环反应中的退火温度需要根据引物的 T<sub>m</sub> 值进行调整, 一般设置成高于引物 T<sub>m</sub> 值 2~3°C 即可; 对于复杂模板或难扩增的片段, 可调节退火温度 (56-68°C 之间梯度调节寻找最适退火温度), 和延长延伸时间来实现高效扩增。
- 根据扩增片段长度设置延伸时间: 3 kb 以内片段延伸速度 1-2s/kb, 3~10kb 片段 2-5 sec/kb, 大于 10 kb 片段 10 sec/kb。对于保真性要求较高的实验, 建议适当降低延伸速度。
- 在保证产物得率的前提下尽量减少循环数可减少错配机率。

## 常见问题及解决方案

| 无产物或少量产物 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 有杂带或弥散条带            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 模板纯度     | 使用高纯度模板                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 使用高纯度模板             |
| 模板用量     | 粗提样品可能需要减少使用量；其他样品模板用量参照反应体系推荐量并适量增加                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 模板用量参照反应体系推荐量调整     |
| 延伸时间     | 适当增加延伸时间                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 有大于目标条带的杂带时可减少延伸时间  |
| 循环数      | 增加循环数至 35 ~ 40 个循环                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 减少循环数至 25 ~ 30 个循环  |
| 退火温度     | 设置退火温度梯度，找到合适的退火温度                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 尝试提高退火温度，可间隔 2°C 设置 |
| 引物浓度     | 适当提高引物浓度                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 降低引物浓度至终浓度为 0.2 μM  |
| 引物设计     | 1.正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1°C 为佳，Tm 值调整至 55 ~ 65°C 为佳（引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算）；<br>2.引物 3'-端最后一个碱基最好为 G 或者 C；引物 3'-端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；引物 3'-端应避免出现发夹结构；<br>3.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；引物的 GC 含量控制在 40% ~ 60% 之间；<br>4.避开引物内部或者两条引物之间有 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；引物设计完毕建议使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，避免非特异性扩增产生。 |                     |

本产品仅供研究使用，请勿用于临床诊断