

YALEPIC[®] Noalign Long-Range Flash HiFi MasterMix

产品货号: YEM51007-A; YEM51007-B

产品保存及运输条件: -20°C 保存, < 0°C 运输

产品概述

YALEPIC[®] Noalign Long-Range 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, 可高效扩增 40 kb 以内的基因组片段, 尤其擅长 10 kb 及以上大片段片段的快速扩增, 扩增速度可达 10 sec/kb。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。

产品组分

序号	产品组分	规格
①	2 × YALEPIC [®] Noalign Long-Range Flash HiFi MasterMix / (Dye)	5 × 1 ml
②	Nuclease-Free ddH ₂ 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 μ l 体系	50 μ l 体系
Template DNA	x μ l	x μ l
Primer F (10 μ M)	0.5~1 μ l	1~2 μ l
Primer R (10 μ M)	0.5~1 μ l	1~2 μ l
2 $\times$ YALEPIC [®] Noalign Long-Range Flash HiFi MasterMix/(Dye)	12.5 μ l	25 μ l
ddH ₂ O	Up to 25 μ l	Up to 50 μ l

注:

- 1) 以 50 μ 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 μ g; 大肠杆菌基因组 DNA: 10~100 ng; 质粒 DNA: 0.1~10 ng; λ DNA: 0.5~10 ng; cDNA: 1~5 μ l. cDNA 模板加入体积不宜超过 PCR 反应总体积的 1/10。
- 2) 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	5-10 sec/kb		延伸
72°C	5 min	1 cycle	延伸

注:

- 1) 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, 如果模板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。
- 2) 循环反应中的退火温度需要根据引物的 T_m 值进行调整, 一般设置成高于引物 T_m 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。
- 3) 根据扩增片段长度设置延伸时间: 10 kb 以内片段 5 sec/kb, 大于 10 kb 片段 10 sec/kb, 2 kb 以内片段可达 2 sec/kb。对于保真性要求较高的实验, 建议适当降低延伸速度。适当降低延伸速度, 也可提高长片段扩增得率。
- 4) 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）； 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； 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； 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