

1. 简介

我们的产品高保真 hyPerFusion DNA 聚合酶能够为大部分 PCR 应用同时提供高保真性，强大的扩增能力和更快的扩增速度。高保真度使得 hyPerFusion DNA 聚合酶成为克隆或其他后续应用的较优选择。HyPerFusion DNA 聚合酶是具有最高的准确性的 DNA 聚合酶中的一个，其错误率比 Taq DNA 聚合酶低 50 倍，比 Pyrococcus Furious DNA 聚合酶低 6 倍。

HyPerFusion DNA 聚合酶具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性。它会在扩增产物两端产生平端，而没有 A 突出(A 突出通常出现在用 Taq 聚合酶扩增的产物中)。在实验中我们的 hyPerFusion 聚合酶能够扩增长达 10 kb 的片段。

2. 产品成分

本产品包含有 hyPerFusion DNA 聚合酶(1 U /μL)和 5X hyPerFusion HF 缓冲液(已添加 Mg²⁺), 50 mM 额外的 MgCl₂ 溶液, 以及 DMSO(100%)。

3. 使用 hyPerFusion DNA 聚合酶的指南

3.1. 在冰上进行实验操作

我们建议将所有反应组分放在冰上。实验者应在打开产品前仔细混合和离心所有管子, 以确保均一性和改善回收率。因为储存缓冲液中含有高甘油含量, 应该小心轻柔地移取 hyPerFusion 聚合酶。

由于该酶具有 3'→5'核酸外切酶活性, 在缺乏 dNTP 的情况下也许可降解引物, 因此 hyPerFusion DNA 聚合酶应最后添加到 PCR 混合物中。

由于 hyPerFusion DNA 聚合酶的性质, 请注意使用 hyPerFusion DNA 聚合酶的实验操作指南, 可能与其他聚合酶的指南不同。

COMPONENT	20 μl REACTION	50 μl REACTION	FINAL CONCENTRATION
ddH ₂ O	add to 20 μL	add to 50 μL	
5 × HF buffer	4 μL	10 μL	1X
2.5 mM dNTP Mixture	1.6 μL	4 μL	200 μM each
10 μM Forward Primer	0.8 μL	2 μL	0.4 μM
10 μM Reverse Primer	0.8 μL	2 μL	0.4 μM
Template	variable	variable	< 250 ng
DMSO (optional)	(0.6 μL)	(1.5 μL)	(3%)
hyPerFusion DNA polymerase	0.4 μL	1 μL	0.02 U/μL

a. 推荐的最终引物浓度为 0.4 μM, 但可以在 0.2-1.0 μM 范围内变化, 您可以调整浓度。一般推荐寡核苷酸引物长度在 20-40 bp 之间, 理想的 GC 含量为 40-60%。

b. 对于富含 GC 的扩增子, 建议添加 DMSO。对于 GC 含量非常低或扩增子 > 20 kb 的扩增子, 不建议使用 DMSO。

c. 使用高质量纯化的 DNA 模板可以大大提高 PCR 反应的成功率。对于低复杂度 DNA (例如质粒, 病毒, λ 或 BAC DNA), DNA 模板量可以在每 50 μL 反应体积 1pg-10ng 之间。对于高复杂度的基因组 DNA, 每 50 μL 反应体积 DNA 模板量应为 50-250 ng。如果从 cDNA 合成反应中获得模板 DNA, 则模板的体积不应超过最终 PCR 反应体积的 10%。

- d. 聚合酶的最佳加入量取决于模板的量和 PCR 产物的长度。每 50 μL 反应体积通常使用 1U HyPerFUision DNA 聚合酶将会产生良好的结果，但是根据扩增子的长度和难度，每 50 μL 反应体系的最佳量可以在 0.5 到 1U 之间。不建议超过 2 U / 50 μL (0.04 U/ μL)，特别是对于长度超过 5kb 的扩增子。
- e. HyPerFUision DNA 聚合酶应该使用高质量的 dNTP 进行扩增。聚合酶不能读取模板链中的 dUTP-衍生物或 dITP，因此不建议使用这些类似物或含有它们的引物。
- f. Mg^{2+} 已经被加入到缓冲液中，实验者不需要重复添加 Mg^{2+} 。如果存在螯合剂（例如 EDTA），或者您想要进一步提高酶的活性，则可能有必要另外添加 Mg^{2+} 。我们的 Kit 中有额外的 MgCl_2 溶液提供。5 \times HF buffer 中 Mg^{2+} 的浓度为 10 mM，即在最终反应体系中 Mg^{2+} 浓度为 2 mM。

3.2. 轻柔的混匀反应体系，并在离心机中离心。

实验者应迅速将反应体系转移至预热至变性温度（98 $^{\circ}\text{C}$ ）的 PCR 仪。如果 PCR 仪没有热盖，请使用矿物油覆盖样品。

3.3. PCR 循环条件

	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98 $^{\circ}\text{C}$	1min	1
Denaturation	98 $^{\circ}\text{C}$	15s	variable
Annealing	55-58 $^{\circ}\text{C}$	15s	
Extension	72 $^{\circ}\text{C}$	15–30s per kb	
Final extension	72 $^{\circ}\text{C}$	2min	1
Hold	4 $^{\circ}\text{C}$	$+\infty$	1

- a. 对于大多数模板，我们建议在 98 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 1 分钟的预变性。一些模板可能需要更长的预变性时间，预变性时间的长度可以延长至 3 分钟。
- b. HyPerFUision DNA 聚合酶的最佳退火温度可能与基于 Taq 的聚合酶明显不同。HyPerFUision DNA 聚合酶具有稳定引物模板杂交的能力。对于大多数模板，我们建议使用 55-58 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度 10-30 秒。如有必要，使用温度梯度来找出每个模板 - 引物对组合的最佳退火温度。
- c. 延伸时间取决于扩增子的长度和复杂性。对于低复杂度的 DNA（例如质粒，病毒， λ 或 BAC DNA），每 1kb 使用 15 秒的延伸时间。对于高复杂度的基因组 DNA，建议每 1 kb 30 秒。对于一些 cDNA 模板，延伸时间可以增加至每 1kb 40 秒，以获得最佳结果。
对于大部分模板，每 1 kb 20 秒可以使用。
- d. 当引物 T_m 值至少为 69 $^{\circ}\text{C}$ (> 20 nt) 或 72 $^{\circ}\text{C}$ (\leq 20 nt) 时，推荐使用两步法。在 2 步法中，即使当引物 $T_m > 72^{\circ}\text{C}$ 时，组合退火/延伸步骤也应在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

	Temperature	Time	Cycles
--	-------------	------	--------

Initial denaturation	98°C	1min	1
Denaturation	98°C	15s	variable
Extension	72°C	15–30s per kb	
Final extension	72°C	2min	1
Hold	4°C	+∞	1

3.4. 电泳

如果需要对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,我们的产品 **SYBR Safe DNA Gel Stain**(Cat: A8743) 可供您选择。

4. 注意点

- a. HyPerFusion 聚合酶退火温度不同于许多常见的 DNA 聚合酶 (如 Taq DNA 聚合酶)。有关于酶的退火温度的设置,我们推荐在 55-58°C。如果在该温度下,您无法获得较为理想的实验结果,可以尝试设置梯度退火温度,以优化实验条件。
- b. 使用 15-30 s / kb 的扩展速度。不要超过 1 分钟 / kb。
- c. 每 50μL 反应体积使用 0.5-1.0 U 的 hyPerFusion DNA 聚合酶。不要超过 2 U / 50 μL。
- d. 每种 dNTP 使用 200 μM 的浓度。不要使用 dUTP。
- e. HyPerFusion DNA 聚合酶产生平末端 DNA 产物。
- f. HyPerFusion 酶的聚合能力较强,实验者在 PCR 的整个实验过程中请在冰上操作,否则室温下酶具有活性,有可能将引物聚合形成引物二聚体,引物消耗后,PCR 效率将会降低。
- g. 使用 hyPerFusion DNA 聚合酶产生的 PCR 产物具有平末端。如果下一步是克隆,那么推荐使用平端克隆。如果您期望选择 T / A 克隆,那么 DNA 应该在 A 突出加入前纯化(任何剩余的 hyPerFusion DNA 聚合酶将降解 A 突出,再次产生平端)。可以用 Taq DNA 聚合酶或 Klenow exo-酶添加无模板的 A 突出。实验者可以在 10 μL 反应混合物中用 1x Taq 缓冲液, 2.5mM MgCl₂, 0.2mM dATP 和 1U Taq DNA 聚合酶在 72°C 孵育 30 分钟。