

**描述:** 5xG5U HiFi PCR Mix 是经优化的 PCR 预混物, 含有 G5U High-Fidelity DNA Polymerase、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 激活剂(Activator)、反应缓冲液、蓝色电泳指示染料, 使用时只需加入模板和引物即可进行 PCR 扩增。

G5U Polymerase, 融合 Q5 和 Q5U 的性能于一身, 该酶来源于高保真 DNA 聚合酶, 并加入了增强的延伸结构, 使其具有超保真性能 (与 Q5 同水平)、长片段扩增能力、高产量。使用该酶可轻松扩增 8kb 的基因组 DNA、20kb 的  $\lambda$ DNA。该酶具有 2kb/min 的延伸速度。该酶具有 5'-3' 的聚合酶活性、强 3'-5' 的外切酶活性 (280xTaq 酶保真度), 产物为平末端。

除此外, 该制品采用了 Mg<sup>2+</sup> 封闭的热启动方式, 以获得最高特异性的扩增。当 Blocker15 加入到反应体系时, Blocker 与 Mg<sup>2+</sup> 形成不溶沉淀物, 聚合酶活性被完全阻断, 在 95°C 加热 2min 后, Activator 水解掉 Blocker, Mg<sup>2+</sup> 得以释放, 从而启动扩增反应。

#### 组分

| 名 称                      | 40Tx50 $\mu$ l | 400Tx50 $\mu$ l |
|--------------------------|----------------|-----------------|
| 5xG5U HiFi PCR Mix(Blue) | 400 $\mu$ l    | 1 ml x4         |
| 25xBlocker15             | 1 ml           | 1 ml            |

- (1) 储存: -20°C 可保存 3 年。
- (2) Blocker15 为可选试剂, 扩增单一无需使用。
- (3) 在使用 Blocker15 时, 其应优先(或同时)于引物加入到 Mix 中。因此建议, 引物预先与 Blocker 混合后使用。
- (4) 引物、模板使用参考表

| 在 1x 反应体系下 | 引物浓度 (nM) | 模板浓度 (ng/ $\mu$ l)              |
|------------|-----------|---------------------------------|
| <3kb       | 200       | 基因组 (0.01-1)<br>简单模板 (0.01-0.1) |
| >3kb       | 100       | 基因组 (0.05-2)<br>简单模板 (0.01-0.1) |

- (5) 扩增片段 GC 含量>65%时, 推荐添加 5xQ Solution (货号: A3002) 至 1x 浓度, 来提升高 GC 含量的扩增性能。

#### 使用方法

##### 1. 按照如下组分配制 50 $\mu$ l PCR 反应体系:

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| 5xG5U HiFi PCR Mix      | 10 $\mu$ l |
| 25xBlocker15            | 2 $\mu$ l  |
| 上游引物(10 $\mu$ M)        | 1 $\mu$ l  |
| 下游引物(10 $\mu$ M)        | 1 $\mu$ l  |
| 模板 DNA                  | x $\mu$ l  |
| ddH <sub>2</sub> O upto | 50 $\mu$ l |

注意: 由于 Blocker 与 Mg<sup>2+</sup> 形成不溶物后, 会迅速沉淀, 因此配制工作液后, 应尽快分装到反应管中。如检测样本较多时, 分装期间可再次旋涡 5s 后再分装。

##### 2. 推荐的“万能 PCR 扩增参数”

|           |      | <1kb | 1-3kb | >3kb    |
|-----------|------|------|-------|---------|
| 预变性       | 95°C | 2min | 2min  | 2min    |
| 循环 1      | 95°C | 15s  | 15s   | 15s     |
| 5 cycles  | 65°C | 30s  | 90s   | 2kb/min |
| 循环 2      | 95°C | 15s  | 15s   | 15s     |
| 23 cycles | 55°C | 15s  | 15s   | 15s     |
|           | 72°C | 30s  | 90s   | 2kb/min |
| 未延伸       | 72°C | 2min | 2min  | 5min    |

特殊说明: (1) 该“万能 PCR 扩增参数”在实际应用中, 引物 T<sub>M</sub> 值 (50-70°C) 范围内均获得良好的扩增。该程序扩增总循环数为 28 (5+23), 如产物扩增亮度不足, 则增加循环 2 的次数到 25-28 个, 通常不宜超过 28。(2) 如果仍然不能获得良好的扩增结果, 则可以改变, 循环 2 中的退火温度为 50-65°C (上表中为 55°C)。

3. 电泳: 1% 琼脂糖凝胶电泳, 上样 5  $\mu$ l, 电泳结束在紫外灯下检测条带。