

## 2× S705 HotPrime Mix

REF: EG26104-S/M/L

### 储存条件

-20°C保存 2 年

### 产品组成

组分	规格 S	规格 M	规格 L
2× S705 HotPrime Mix	1 ml	5×1 ml	20×1 ml

### 产品简介

2× S705 HotPrime Mix 是即用型 2× 预混合溶液，包含 S705 HotPrime DNA Polymerase、dNTPs 和精心优化的反应缓冲液，只需加入模板、引物和水即可进行高保真 PCR 反应。S705 HotPrime DNA Polymerase 使用抗体法进行封闭，室温下酶活被完全抑制，95°C 加热 30 s 即可完全释放活性，从而减少非特异性扩增。

### 适用范围

本产品适用于以基因组 DNA、cDNA、质粒以及粗品为模板的 PCR 反应。

### 使用方法

#### 一、反应体系

试剂	使用量
2× S705 HotPrime Mix <sup>a</sup>	25 μl
上游引物 (10 μM)	1 μl
下游引物 (10 μM)	1 μl
模板 DNA <sup>c</sup>	x μl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μl

a. 当扩增片段 GC 含量 >60% 且优化条件也无法正常扩增时，推荐调整 PCR 程序，程序推荐：Touchdown PCR（降落 PCR）程序。

#### 二、推荐的模板用量及反应条件

##### 1. 模板用量：

模板种类	推荐用量
基因组 DNA	10~200 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg~50 ng
cDNA*	1~20 μl
粗品	1~5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

注：此处推荐量为愚公逆转录产物的使用体积，若使用其他品牌逆转录试剂，请根据 PCR 结果自行调整 cDNA 体积，防止其抑制 PCR 扩增。

#### 2. 反应程序：

##### ① 三步法：

步骤	温度	时间
预变性 <sup>b</sup>	95°C	3~5 min
变性	95°C	10 s
退火 <sup>c</sup>	55~72°C	15 s
延伸 <sup>d</sup>	72°C	30 s/kb
终延伸	72°C	5 min

← 30~35 Cycles

b. 对于普通模板，预变性可缩短至 30~60 s；对于复杂模板，例如高 GC 序列，推荐延长预变性时间到 3~5 min 以充分变性；大肠杆菌菌落 PCR：建议将预变性调整 10 min，无需预裂解即可高效扩增；酵母菌菌落 PCR：无需调整预变性时间，但需要对酵母菌进行预裂解。建议使用以下预裂解方式：向酵母菌中添加终浓度 20 mM 的 NaOH 后 95°C 预裂解 10 min，或将酵母菌使用液氮反复冻融 2~5 次；

c. 根据引物 T<sub>m</sub> 值设置退火温度。如引物 T<sub>m</sub> 值 ≥72°C，可删除退火步骤，直接进行后续的延伸步骤（两步法 PCR）。如果需要，可以建立一个温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外，退火温度直接决定扩增特异性。如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度；

d. 对于大多数模板，30 s/kb 即可有效扩增；对于一些复杂模板，可延长延伸时间至 30~60 s/kb。

##### ② 两步法<sup>e</sup>：

步骤	温度	时间
预变性	95°C	3~5 min
变性	95°C	10 s
退火 & 延伸	65~68°C	30 s/kb
终延伸	72°C	5 min

← 30~35 Cycles

e. 通常情况下使用两步法和三步法进行 PCR 扩增，性能无明显差异，可以根据操作习惯自行选择。但对于一些复杂模板（如长片段，T<sub>m</sub> 分布不均匀，特殊结构模板），可以尝试两步法或者 Touchdown PCR（降落 PCR）法。此外，使用质粒为模板进行点突变时，也建议使用两步法。

##### ③ Touchdown PCR（降落 PCR）<sup>f</sup> 法：

步骤	温度	时间
预变性	95°C	3~5 min
变性	95°C	10 s
退火	68°C (-0.2°C/cycle)	15 s
延伸	72°C	30 s/kb
终延伸	72°C	5 min

← 30~40 Cycles

f. 该程序仅供参考，Touchdown PCR（降落 PCR）有多种程序可灵活调整，请根据实验需求与习惯自行决定是否采用。

### 注意事项

- 请不要使用含尿嘧啶的引物和模板。
- S705 HotPrime DNA Polymerase 具有较强的校正活性，产生的扩增产物是平末端，如果用于下一步克隆实验，建议使用平末端克隆。如果扩增产物需要用于 TA 克隆，加 A 之前须先进行 DNA 纯化。
- 为了提高扩增成功率和产量，请使用高质量的模板。