



NileHiFi® Long Amplicon PCR Kit

Cat. No. PC002 (50 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

I 产品介绍

本产品具有良好的扩增性，可扩增 18 kb 人来源 gDNA 以及 30 kb λ 噬菌体 DNA 为模板等大片段 DNA，同时可扩增高 GC% 片段，适用范围广，实验过程中仅需添加引物与模板，操作简便。本产品中已包含反应所需的 Polymerase、 Mg^{2+} 、dNTP 等，只需准备模板、引物及灭菌水，即可对靶点进行快速、特异地扩增。

产品特点：NileHiFi® Long Amplicon PCR Kit 含有在常温下能够抑制其聚合酶活性的抗体，常温下或未热激活前可逆抑制聚合酶活性。聚合酶是具有 3'-5'校正功能的热启动型高保真聚合酶，在本试剂盒优化的 PCR Mix 中可有效降低非特异性扩增。

II 产品应用

- 高保真扩增
- 长片段扩增
- 平末端克隆
- TA 克隆
- 复杂模板扩增

III 试剂盒组份

组分货号	组分	规格	保存温度
PC002-01	Long Amplicon DNA Polymerase (1 U/ μ l)	100 μ l	-20 $^{\circ}$ C
PC002-02	2 \times Long Amplicon PCR Mix	1.3 ml	
PC002-03	50 mM Mg^{2+}	50 μ l	

储存条件：为保证使用效果，请将试剂盒保存于-20 $^{\circ}$ C，注意避免反复冻融，建议分装储存。

活性定义

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 74 $^{\circ}$ C，30 分钟内，摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 个活性单位（U）。

IV 注意事项

使用前请确保试剂已彻底溶解并混匀，使用过程中可能会出现少量气泡，轻弹管壁后瞬时离心即可。请注意避免反复冻融。

V 操作流程

1. 引物设计原则

(1) DNA 片段 \leq 8 kb

使用专业引物设计软件或网页设计引物，例如 Primer Premier 5 或 NCBI Primer Blast。若 DNA 片段 \leq 8 kb，引物设计长度建议为 20-25 bp， T_m 值建议高于 55 $^{\circ}$ C，上下游引物的 T_m 值避免相差太大，提高特异性，引物 3'端尽量避免 3 个以上的碱基重复序列。

(2) DNA 片段 \geq 8 kb

引物长度建议为 25-30 bp， T_m 值建议高于 60 $^{\circ}$ C，上下游引物的 T_m 值避免相差太大，引

物 3' 的 GC 含量不宜过高。由于大分子 DNA 片段的扩增受影响因素更多，建议着重优化引物设计，择优使用。

2. 加样体系 (25/40/50 µl)

组分	25 µl	40 µl	50 µl	终浓度
2× Long Amplicon PCR Mix (Mg ²⁺ 、dNTP plus) ^a	12.5 µl	20 µl	25 µl	1×
Forward Primer	0.4 µM	0.4 µM	0.4 µM	0.4 µM
Reverse Primer	0.4 µM	0.4 µM	0.4 µM	0.4 µM
Template ^b	100 ng/100 pg	100 ng/100 pg	100 ng/100 pg	100 ng/100 pg
Long Amplicon DNA Polymerase ^c (1U/µl)	1 µl	1.5 µl	2 µl	Various
ddH ₂ O	Up to 25 µl	Up to 40 µl	Up to 50 µl	—

a. Long Amplicon DNA Polymerase 的最适 Mg²⁺浓度为 1.5~3 mM，如未获得特异性目的条带，则请根据 VI 常见问题及解决措施来进行调整与优化。

b. 若模板为 gDNA，则不少于 50 ng；若模板为质粒 DNA，则 100 pg 即可。

c. 不同体积的 PCR 体系仅需调整聚合酶使用量即可，分别为 1 µl/25 µl；1.5 µl/40 µl；2 µl/50 µl。

3. PCR 反应程序设置

(1) 扩增 8 kb 以下的短片段，可先尝试 3 step PCR，若特异性较差可参考 VI 常见问题及解决措施进行适当调整。

95°C ^a	2 min	} 30 cycles
95°C	30 sec	
55~60°C ^b	30 sec	
72°C	40 sec/kb	
72°C	5 min	
4-10°C 保温		

(2) 对于高 GC% 模板或者大于 8 kb 长片段的扩增，推荐使用 2 step PCR:

95°C	2 min	} 30 cycles
95°C	30 sec	
68°C ^c	40-50 sec/kb	
72°C	5 min	
4-10°C 保温		

a. 预变性时间请至少 2 min，使 DNA 解链完全以及彻底激活聚合酶；

b. 退火温度请根据引物 T_m 值进行调整，若引物 T_m 值高于 55°C，退火温度可设定为 60°C，若引物 T_m 值低于 55°C，退火温度可设定为 55°C；

c. 根据长片段引物的 T_m 值，引物设计原则如上文所述，延伸速度请参考如下：

PCR 产物	≤12 kb	≥12kb	λ DNA
延伸速度	40 sec/kb	50 sec/kb	30 sec/kb

4. 琼脂糖凝胶电泳检测

(1) PCR 产物请使用 1×TAE buffer 进行电泳检测，长片段 PCR 产物建议使用低浓度琼脂糖凝胶，并使用低电压延长电泳时间加以区分长片段，例如：

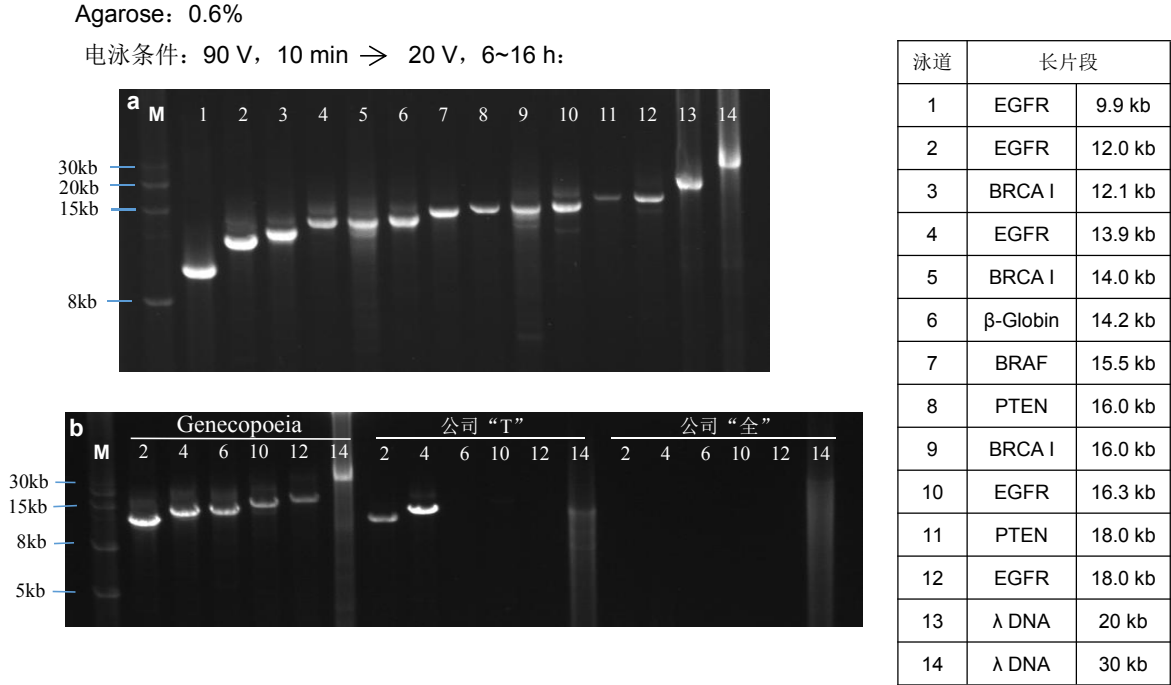


图 1. Long Amplicon PCR Kit 长片段扩增。图 a 为 Genecopoeia 不同长片段的扩增，其中片段长度为随机挑选，同时包含相应的突变靶点（例如 V600E, L858R, dE746-A750 等）；图 b 为 Genecopoeia Long Amplicon PCR Kit 长片段扩增与公司“T”和公司“全”的同类型试剂盒的性能比较。

(2) 短片段 PCR 产物建议使用 1%琼脂糖凝胶进行电泳，例如：

Agarose: 1%

电泳条件: 140 V, 20 min

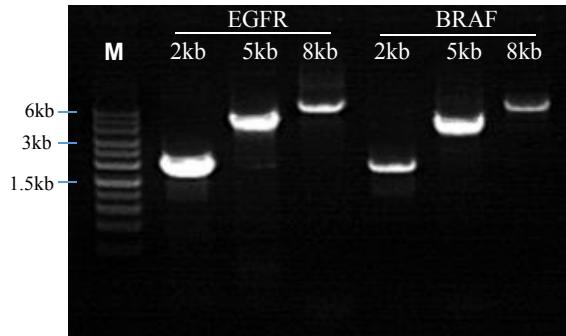


图 2. Genecopoeia Long Amplicon PCR Kit 短片段扩增。片段长度为随机挑选，同时包含相应的突变靶点（例如 V600E, dE746-A750 等）。

VI 常见问题及解决措施

问题	可能原因	解决措施															
无特异性片段或非特异现象较严重	引物	参考 V 操作流程 1。引物设计原则进行优化，建议设计 2 对以上的引物，择优使用。															
	模板	提高模板纯度，使用适量模板 DNA，基因组 DNA 不应低于 50 ng，质粒 DNA 为 100 pg 即可。															
	Mg ²⁺ 浓度	建议以 0.5 mM 的梯度适当增加 Mg ²⁺ 的反应终浓度进行反应体系的优化。															
	PCR 程序	1. 若 3 step PCR 结果不理想，可尝试 2 step PCR； 2. Slowdown PCR 提高特异性： <table style="margin-left: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">95°C</td> <td style="padding-right: 10px;">2 min</td> <td rowspan="4" style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;">15 cycles</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>x=70°C, x=x-1</td> <td>20 sec</td> </tr> <tr> <td>72°C</td> <td>40-50 sec/kb</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>30 sec</td> <td rowspan="2" style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="2" style="vertical-align: middle;">20 cycles</td> </tr> <tr> <td>68°C</td> <td>40-50 sec/kb</td> </tr> </table>	95°C	2 min	}	15 cycles	95°C	30 sec	x=70°C, x=x-1	20 sec	72°C	40-50 sec/kb	95°C	30 sec	}	20 cycles	68°C
95°C	2 min	}	15 cycles														
95°C	30 sec																
x=70°C, x=x-1	20 sec																
72°C	40-50 sec/kb																
95°C	30 sec	}	20 cycles														
68°C	40-50 sec/kb																
Smear 现象较严重	引物 T _m 值	参考 V 操作流程 1。引物设计原则进行优化，建议设计 2 对以上的引物，择优使用。															
	Polymerase	适当调整 Polymerase 的使用量，例如 0.6 μl/25 μl 或者 1.5 μl/25 μl。															
	引物浓度	可在 0.2 μM~0.4 μM 之间进行调整。															
	延伸时间	适当缩短延伸时间。															
	PCR 程序	适当减少循环数，例如 25~30。															
特异性产物产量较低	模板	适当增加模板量，例如 200 ng。															
	延伸时间	在特异性良好且无严重 Smear 现象的条件下，适当延长延伸时间，例如 1 min/kb。															
	PCR 程序	循环数可设定为 32~35，提高 PCR 产物产量。															

VII 有限使用许可及质保声明

使用限制

以下条款适用于 NileHiFi® Long Amplicon PCR Kit 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2019, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)

PC002-101019