

Version: AF 1.0 (2023.08.21 修订)

## 2×SparkHiFi Max Master Mix(with dye)

目录号: AF0802

### 01/产品组分

组分名称	AF0802-A	AF0802-B
2×SparkHiFi Max Master Mix (with dye)	1 mL	1 mL×5
ddH <sub>2</sub> O	1 mL	1 mL×5

### 02/保存条件

本产品组分-20℃保存。

### 03/产品概述

2×SparkHiFi Max Master Mix 包含 SparkHiFi DNA Polymerase、dNTPs 和优化的反应缓冲液，使用时只需加入模板、引物，并补足水至 Mix 终浓度为 1×即可，减少了移液操作，提高了通量和结果的重现性。

SparkHiFi DNA Polymerase 通过基因工程改造，大大提高了扩增速度、保真性和产量，其保真度是普通 Taq 酶的 80 倍以上。2× Mix 中添加了独特的延伸因子、特异性促进因子以及平台期解抑制因子，使其在长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增灵敏度等方面都有大幅度提升。此外，本产品对 PCR 抑制剂具有良好的抵抗能力，同时体系中加入的保护剂使得 2× Mix 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。

使用 λDNA、质粒等简单模板，可以有效扩增长达 40 kb 的片段；使用基因组 DNA 等复杂模板，可以扩增长达 20 kb 的片段；使用 cDNA 模板，可以有效扩增长达 10 kb 的片段。本产品扩增产物为平末端。

### 04/质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74℃下孵育 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μL 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37℃温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20 U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌 DNA 残留检测：50 μL 体系中，以 ddH<sub>2</sub>O 为模板，扩增 *E. coli* 16s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

功能检测：以 10 ng λDNA 为模板扩增 30 个循环，1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，可见各自单一的目的条带。

## 05/适用范围

本产品适用于以基因组 DNA、cDNA、质粒、高 GC 样本以及粗品（细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品）为模板的 PCR 反应。

## 06/实验流程

### 反应体系

操作在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀后使用，用完后请及时放回 -20°C 保存。所需反应体系不同时，可按下表等比例扩大或缩小产品用量。

Components	Volume
2×SparkHiFi Max Master Mix (with dye)	25 μL
Forward Primer(10 μM)	2 μL
Reverse Primer(10 μM)	2 μL
Template	optional
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μL

▲PCR 反应体系中，不同模板的最佳反应浓度有所不同，50 μL 体系推荐模板使用量如下：

模板种类	模板使用量
质粒或病毒 DNA	10 pg-30 ng
基因组 DNA	50-400 ng
cDNA	1-5 μL(不超过 PCR 反应总体积 1/10)

### 反应程序

95°C:	30 sec-3 min	} 30-35 cycles
95°C:	15 sec	
T <sub>m</sub> :	15 sec	
72°C:	15-60 sec/kb	
72°C:	5 min	

▲推荐大多数模板的预变性温度为 95°C，质粒或病毒 DNA，建议时间为 30 sec，基因组或 cDNA 建议时间为 3 min；

▲退火温度需根据引物的 T<sub>m</sub> 值进行调整，若有需要，可通过温度梯度 PCR 实验寻找引物与模板结合的最佳退火温度；

▲不同种类的模板选择合理的延伸时间有助于提高 PCR 扩增产量，如：使用质粒等复杂程度较低的 DNA 做模板时，可用 15-30 sec/kb 的速度进行扩增；使用基因组、cDNA 等复杂程度较高的 DNA 做模板时，可用 30-60 sec/kb 的速度进行扩增。

## 07/结果检测

本产品含有蓝色示踪染料，反应结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳；也可经过纯化处理，用于酶切、连接、测序等后续操作。

## 08/注意事项

- ◇ 对于 GC 含量很高的模板，如若上述程序扩增不佳时，预变性和变性温度可以提高到 98°C，变性时间 2-3 min 即可，SparkHiFi 耐热性强，98°C 对 SparkHiFi 的活性无改变。
- ◇ 请使用高质量的模板，如产量较低可适当提高模板投入量。
- ◇ 合理增加延伸时间可以提高扩增产物量，延伸时间太长会导致非特异扩增增加，因此，要选择合适的延伸时间。
- ◇ 引物设计注意事项：
  - 引物 3'端最后一个碱基最好选择 C 或 G；
  - 引物 3'端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；
  - 引物 3'端尽量避免出现发夹结构；
  - 引物 Tm 值控制在 55°C-65°C 之间；
  - 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；
  - 引物 GC 含量控制在 40%-60% 之间；
  - 正向引物和反向引物 Tm 值以及 GC 含量尽可能一致。

## 09/相关产品

- AF0102 2×Spark Taq PCR Master Mix (with dye)
- AE0101 胶回收/PCR 产物纯化试剂盒
- AD0102 SPARKeasy 高纯质粒小量快速提取试剂盒
- AK0601 Spark HiFi Seamless Cloning Kit
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker

## 10/常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
无扩增产物 或者扩增产物量过低	<p>模板：使用高质量模板；</p> <p>模板添加量参照反应体系推荐量并适当增加；</p> <p>粗提样本添加量不宜过多，容易抑制反应。</p>
	<p>引物：适当提高引物浓度；</p> <p>设置退火温度梯度，找到合适的引物退火温度。</p>
	<p>程序：适当增加延伸时间至 30 sec/kb - 1 min/kb；</p> <p>增加循环数至 36-40 个循环。</p>
条带非特异 或者弥散	<p>模板：使用高质量模板；</p> <p>模板添加量参照反应体系推荐量并适当减少。</p>
	<p>引物：优化引物设计，重新设计引物；</p> <p>适当减少引物浓度（0.2-0.3<math>\mu</math>M）；</p> <p>设置退火温度梯度，尝试提高退火温度。</p>
	<p>程序：适当减少延伸时间；</p> <p>减少循环数至 25-30 个循环；</p> <p>使用两步法程序。</p>

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

