



KAPA HiFi 热启动 高保真酶预混液 PCR 试剂盒

KR0370 – v9.17

产品描述

KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶是一种新型 B 族 DNA 聚合酶，经过生物加工增加了对 DNA 的亲合力，无需借助辅助蛋白或 DNA 结合域。与野生型 B 族 DNA 聚合酶相比，这种酶固有的高延伸能力，能显著改善产量、催化速度和灵敏度。此外，还能显著改善扩增长片段靶标的能力，以及扩增高 GC 和高 AT 靶标的能力。这种酶与专用抗体结合，能够抑制酶直至第一次变性步骤。从而可防止在反应体系配制期间发生非特异性扩增，还能提高灵敏度，并改善反应效率。

在高保真酶预混液 PCR 试剂盒中，KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶以方便的 2X 预混液形式提供，其中包含了除引物和模板之外的所有反应组分。每份 1x 浓度的 ReadyMix 反应体系中含有 0.3 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、0.5U KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶（每 25μL 反应含 0.5U）和稳定剂。

KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液专为不同类型片段大小的靶标的常规高保真 PCR 而设计。其错误率比野生型 Taq DNA 聚合酶低约 100 倍，但成功率和产量高于野生型 B 族（校正）DNA 聚合酶。此外，KAPA HiFi HotStart 比野生型 B 族 DNA 聚合酶需要的反应时间明显更短。

KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶具有 5'→3'聚合酶和 3'→5'外切核酸酶（校正）活性，但没有 5'→3'外切核酸酶活性。强大的 3'→5'外切核酸酶活性在 DNA 扩增过程中提供了极高的准确性，使得 KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶在所有 B 族 DNA 聚合酶中发表的错误率最低（每加入 3.6 x 10⁶ 个核苷酸发生 1 个错误）。这种保真度比野生型 Taq DNA 聚合酶高约 100 倍，也比其他 B 族 DNA 聚合酶和聚合酶混合物的保真度更高，可高至 10 倍。

使用 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液生成的 DNA 片段可用于常规下游分析和应用，包括限制酶消化、克隆和测序。使用 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液生成的 PCR 产物是平末端的，但可以加 3'-dA 尾，应用于 TA 克隆（参见重要参数：TA 克隆）。

Kapa/Roche 试剂盒编码和组分

KK2600 07958919001	KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 (2X) *	0.25 mL
KK2601 07958927001	KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 (2X) *	1.25 mL
KK2602 07958935001	KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 (2X) *	6.25 mL

* 1x 浓度中含有 2.5mM MgCl₂

快捷提示

- KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 PCR 试剂盒包含精心设计的 KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶 - 专为快速和全能型的高保真 PCR 而开发。
- 一份 2X 预混液提供了缓冲液、MgCl₂、dNTPs 和酶，使用方便，只需再添加引物和模板即可。
- KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶在已发表的所有 B 族 DNA 聚合酶中的错误率最低（每加入 3.6 x 10⁶ 个核苷酸发生 1 个错误）。
- 从基因组 DNA 扩增高达 15 kb 的靶标，低复杂度的靶标可扩增 20 kb。
- 每个循环在 98°C 变性 20 秒。
- 最佳退火温度通常高于其他 PCR 缓冲系统。使用退火温度梯度来确定最佳退火温度。
- 为确保最高保真度，请使用高质量 DNA 和尽可能低的循环次数。

产品应用

KAPA HiFi HotStart PCR 试剂盒非常适合用于：

- 常规测序的 PCR（直接测序或克隆 PCR 产物的测序）
- 新一代测序文库扩增（与 KAPA 文库扩增实验方法结合使用时）
- 扩增 DNA 片段用于克隆和蛋白质表达或基因组表征
- 定点突变。

有关这些应用和其他高保真 PCR 应用的更多信息，请参阅 www.sequencing.roche.com 上有关定点突变、常规高保真度 PCR 和高 GC 区域的高保真度 PCR 的 KAPA HiFi 应用说明。

标准 PCR 实验方法

重要！KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液包含一份经过生物加工的 B 族（校正）DNA 聚合酶和独特配方的缓冲液，需要专门的反应条件。如果不遵守这些条件，则可能出现反应失败。有关更多信息，请参阅重要参数。

步骤 1：制备 PCR 反应预混液

- KAPA HiFi HotStart 反应必须在冰上进行配制，因为在室温下酶的高校正活性会导致引物快速降解。
- 需要确保所有试剂均已正确解冻并混合。
- 制备适量的 PCR 反应预混液，其中包含了后续反应所需的通用组分。
- 根据下表计算每种组分所需的量：

组分	25 μ L 反应 ^{1,2}	最终浓度
PCR 级水	最多为 25 μ L	N/A
2X KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 ^{3,4}	12.5 μ L	1X
10 μ M 正向引物	0.75 μ L	0.3 μ M
10 μ M 反向引物	0.75 μ L	0.3 μ M
模板 DNA ⁵	根据需要	根据需要

¹ 反应体积可在 10-50 μ L 的范围内调节。对于 25 μ L 以外的体积，按比例稀释试剂。不推荐反应体积 >50 μ L。

² 当用于新一代测序文库扩增时，请使用 KAPA 文库扩增试剂盒提供的实验手册。

³ KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液含有 2.5 mM MgCl (1X)。可以单独再添加额外的 MgCl，但通常没有必要。

⁴ KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液在专用的反应缓冲液中含有 0.3 mM 的每种 dNTP (1X) 和 0.5 U 的 KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶（每 25 μ L 反应）。

⁵ 第一种方法是在每 25 μ L 反应中，使用 <100 ng 基因组 DNA (10-100 ng) 和 <1 ng 不太复杂的 DNA (0.1-1 ng)。

步骤 2：配制各自的反应体系

- 将适量的 PCR 反应预混液、模板和引物转移到 PCR 板的各个 PCR 管或孔中。
- 盖上或密封各个反应，混合并短暂离心。

步骤 3：运行 PCR

- 使用以下循环方案¹执行 PCR：

步骤	温度	持续时间	循环
预变性 ²	95°C	3 分钟	1
变性 ³	98°C	20 秒	15-357
退火 ^{4,5}	60-75°C	15 秒	
延伸 ⁶	72°C	15-60 秒/kb	
最终延伸	72°C	1 分钟/kb	1

¹ 当用于新一代测序文库扩增时，请使用 KAPA 文库扩增试剂盒提供的实验手册。

² 对于大多数应用，在 95°C 下预变性 3 分钟即已足够。对于 GC 含量高 (> 70%GC 含量) 的靶标，需要在 95°C 下预

变性 5 分钟。

³ KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液的盐浓度比传统 PCR 预混合物更高，这会影响 DNA 变性。为确保复杂且 GC 含量高的靶标完全变性，在循环过程中使用 98°C 的温度变性。

⁴ 除 DNA 变性外，高盐也会影响引物退火。特定引物组的最佳退火温度可能与常规 PCR 预混合物使用的退火温度不同（更高）。推荐使用退火温度梯度 PCR，以确定 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液所需的最佳退火温度。如果梯度 PCR 不可行，则首选在 65°C 退火。

⁵ 可以使用两步扩增法，其中退火/延伸温度在 68-75°C 的范围内，退火/延伸时间为 30 秒/kb。

⁶ 对于 \leq 1kb 的靶标，每个循环使用 15 秒延伸，而对于较长的片段，或为了提高产量，可使用 30-60 秒/kb 延伸。

⁷ 为获得最高的保真度，需使用 \leq 25 个循环。在模板浓度非常低或反应效率低导致产量低的情况下，可进行 30-35 个循环，以产生足够用于下游应用的产物。

重要参数**退火温度**

由于 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液的盐浓度较高，故其特定引物组的最佳退火温度通常与其他缓冲液系统不同。当首次使用含有特定引物对的试剂盒时，可通过退火温度梯度 PCR 来确定最佳退火温度。我们推荐使用 60-72°C 的梯度，但某些检测可能需要更高的退火温度。对于最佳退火温度为 68°C 或更高的检测，可以在最佳退火温度下进行 2 步循环。罕见低于 60°C 的最佳退火温度，但在使用 AT 含量较高的引物时可能需要低于 60°C 的退火温度。

如果梯度 PCR 不可行，则首选 65°C 的退火温度，并根据获得的结果调整退火温度：

- 如果仅获得了特异性产物，但产量较低，则将退火温度调低 1-2°C。
- 如果除特异性产物之外还形成了非特异性产物，则将退火温度调高 1-2°C。
- 如果没有产物（特异性或非特异性），则将退火温度调低 5°C。还可能需增加 MgCl₂ 浓度。
- 如果仅形成了非特异性产物（呈阶梯样模式），则将退火温度调高 5°C，或尝试针对 GC 含量高的 PCR 的推荐方案（参见重要参数：GC 含量高的 PCR）。

注：使用 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液时特定引物对的最佳退火温度通常比使用 KAPA HiFi Fidelity Buffer 时的最佳退火温度低 2-3°C，比使用 KAPA HiFi GC Buffer 时的最佳退火温度高 2-3°C。

引物和模板 DNA 质量

使用 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液进行 PCR 时，其他影响成功的关键因素是引物设计和质量。应仔细设计引物，以尽可能地消除出现引物二聚体和非特异性退火的可能性，并且需要将 GC 含量

控制在 40-60%。GC 含量 >60% 的引物可能需要更高的变性温度和/或更长的变性时间，而 GC 含量 <40% 的引物可能需要退火温度 <60°C，和/或增加 MgCl₂ 和引物浓度。此外，引物组设计时应具有相似的理论变性温度。

注：需要始终在缓冲液（例如 10 mM Tris-HCl，pH 8.0-8.5）中稀释和储存引物，而不是 PCR 级水中，以防止降解并保持引物质量。

高质量的模板 DNA 对于高保真度扩增至关重要。当扩增较长的片段（> 1kb）时，存在降解、损坏或剪切问题的模板 DNA 尤为困难。为了防止降解并保持引物质量，需要始终在缓冲液（例如 10 mM Tris-HCl，pH 8.0-8.5）中稀释和储存引物，而不是 PCR 级水中。

从低复杂度模板（例如质粒 DNA）进行扩增，通常极少需要优化。基于低靶标拷贝数的应用（例如，当从基因组模板扩增单拷贝基因时，或当使用 cDNA 作为模板时）通常更具挑战性。对于质粒 DNA，每 25 µL 反应使用 1-10 ng 模板就足够了，而对于复杂的基因组 DNA 或 cDNA，则可能需要多达 100 ng 的模板。

MgCl₂ 浓度

KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液含有 2.5 mM 的最终浓度（1X）MgCl₂，足以满足大多数应用。可能需要更高 MgCl₂ 浓度的应用包括：长 PCR（> 10kb）和 AT 含量高或 GC 含量低（<40%）的扩增。

GC 含量高的 PCR

对于 GC 含量高的扩增子，反应可加入 5% DMSO、1X KAPA 增强子 1（随 KAPA2G Robust PCR 试剂盒提供）或 1 M 甜菜碱，以提高产量和/或特异性。

TA 克隆

使用 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液产生的 DNA 片段，可以直接用于平末端克隆，或使用限制性内切核酸酶的克隆。对于 KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液 PCR 产物的 TA 克隆，首先纯化 PCR 产物以去除残留的 KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶，因为其残留的校正活性将会去除在加 A 尾反应期间接上的所有 dA 尾。进行加 A 尾时，需要加入纯化的 PCR 产物、1X Taq 缓冲液（含有 1.5 mM MgCl₂）、0.2 mM dATP 和 1U Taq DNA 聚合酶，并在 72°C 下孵育 5 分钟。

产品规格

运输、储存和处理

KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液是采用干冰或冰袋运输，具体取决于目的地国家。收货后，需将试剂盒组分储存在 -15°C 至 -25°C 的恒温冰箱中。如果能够在这些条件下储存并进行正确的处理，试剂盒将保持完全活性，直至试剂盒标签上标明

的失效日期。KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液含有稳定剂，即使在 -15°C 至 -25°C 下储存，也不会结冰。这种稳定剂不会影响产品的保质期。

需要始终确保产品在使用前已完全解冻和混合。短时间使用时，可将试剂储存在 4°C 下（不超过 1 个月）。长期储存时需要重新置于 -15°C 至 -25°C 下。假设所有组分都小心处理且没有受到污染，则如果试剂盒在短时间内（不超过 3 天）被不小心留在了室温下，该试剂盒预计也不会被损坏。不推荐在室温和 4°C 下长期储存。请注意，如果试剂盒在高于 -15°C 至 -25°C 的温度下储存，并在使用过程中受到污染，则更容易发生降解，因此在较高温度下储存的风险由用户自行承担。

质量控制

已确认每一批 KAPA HiFi 热启动高保真 DNA 聚合酶中所含有的蛋白残留 <2%（Agilent Protein 230 Assay）。KAPA HiFi 热启动高保真酶预混液经过了严格的质量控制测试，不含污染的外切和内切核酸酶活性，且符合有关 DNA 污染水平的严格要求。

故障排除

症状	可能的原因	解决方案
无扩增或低产量	循环方案	使用在 95°C 下预变性 3-5 分钟的推荐方案，并在 98°C 下进行循环变性 20 秒。 将延伸时间增加至最多 1 分钟/kb。 增加循环数。
	退火温度太高	将退火温度降低 5°C。 通过梯度 PCR 优化退火温度。
	模板 DNA 数量和质量	过量的模板 DNA 螯合 Mg ²⁺ 。将模板浓度降低至 <100 ng，或增加 MgCl ₂ 。 检查模板 DNA 质量。在缓冲液中储存和稀释，而不是在水中。
	引物浓度	一些引物的退火效率要高于其他引物。增加引物浓度，或优化 MgCl ₂ 以改善引物结合。在缓冲液中储存并稀释引物，而不是在水中。
	MgCl ₂	优化 MgCl ₂ 浓度。AT 含量高的 PCR 通常需要更多的 MgCl ₂ 。
非特异性扩增或污染	模板 DNA	每次反应使用 <100 ng 的 DNA，或减少循环次数。 检查模板 DNA 质量。
	循环方案	过长的退火和/或延伸时间将导致非特异性扩增，通常是比靶标条带更大的条带。将退火和延伸时间减少到各最少 10 秒。 增加循环数。
	退火温度太低	欠佳的退火温度将导致出现通常小于靶标条带的非特异性扩增子。请参阅重要参数：退火温度。
	靶标 GC 含量	向反应中加入 5% DMSO、1X KAPA 增强子 1 或 1 M 甜菜碱，以促进 GC 含量高的模板变性。
	引物浓度	一些引物的退火效率要高于其他引物。降低引物浓度。在缓冲液中储存并稀释引物，而不是在水中。



制造, 研发
南非开普敦
电话: +27.21.448.8200
传真: +27.21.448.6503

技术支持
sequencing.roche.com/support

© 2017 KAPA 是罗氏公司的商标。其他所有产品名称或商标均属于其所有者。