

## MonAmp™ 2× MonHI-FI HS Mix

REF: MP35201

### 储运条件

-20°C保存，避免反复冻融。

### 产品组成

| 组分 / 规格                    | MP35201S | MP35201M |
|----------------------------|----------|----------|
| MonAmp™ 2× MonHI-FI HS Mix | 1 ml     | 5×1 ml   |
| ddH <sub>2</sub> O         | 1 ml     | 5×1 ml   |

### 产品简介

MonAmp™ 2 × MonHI-FI HS Mix 包含定向进化而来的高保真 DNA 聚合酶，该聚合酶具有 5'-3' 持续合成活性和 3'-5' 核酸外切酶活性，其扩增产物是平末端。并且添加了能够抑制 5'-3' 聚合酶活性的单克隆抗体，可进行高特异性的热启动 PCR，buffer 里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产量方面得到了大幅度提升。使用 λDNA 等简单模板，MonHI-FI HS Mix 可以有效扩增长达 20 kb 的片段；使用基因组 DNA 等复杂模板，可以扩增长达 12 kb 的片段；使用 cDNA 模板，可以有效扩增长达 10 kb 的片段。其保真度是 Taq DNA Polymerase 的 50~60 倍。此外，MonHI-FI HS Mix 对 PCR 抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接 PCR。

### 使用方法

#### 1. 常规 PCR 反应体系

| 试剂                                       | 使用量      | 终浓度        |
|------------------------------------------|----------|------------|
| MonAmp™ 2× MonHI-FI Max Mix <sup>a</sup> | 25 µl    | 1×         |
| 正向引物 (10 µM) <sup>b</sup>                | 1~2 µl   | 0.2~0.4 µM |
| 反向引物 (10 µM) <sup>b</sup>                | 1~2 µl   | 0.2~0.4 µM |
| DNA 模板 <sup>c</sup>                      | X µl     |            |
| ddH <sub>2</sub> O                       | To 50 µl |            |

a. 2× MonHI-FI HS Mix 中已含有 Mg<sup>2+</sup>，终浓度为 2 mM；

b. 引物推荐终浓度为：为 0.2~0.4 µM，效果不佳时可以在 0.1~1 µM 浓度范围内进行调整；

c. 不同模板最佳反应浓度有所不同，以 50 µl 体系为例：模板为基因组 DNA 时，一般推荐的使用量为 50~400 ng；模板为质粒或病毒 DNA，推荐 10 pg~30 ng；模板为 cDNA 时，推荐的使用量为 1~5 µl (≥ 200 ng RNA 相当量)。

#### 2. 常规 PCR 反应程序

| 步骤              | 温度      | 时间           |
|-----------------|---------|--------------|
| 预变性             | 98°C    | 40 s         |
| 变性              | 98°C    | 10 sec       |
| 退火              | 55~65°C | 20~30 sec    |
| 延伸 <sup>a</sup> | 72°C    | 10~30 sec/kb |
| 终延伸             | 72°C    | 5 min        |

25~35 Cycles

a. 延伸速率设置为 30 sec/kb 可以满足多数实验，如果扩增效果不佳，可以适当延长延伸时间提高扩增产物量。

#### 3. 复杂模板

##### 两步法反应程序

| 步骤                   | 温度      | 时间       |
|----------------------|---------|----------|
| 预变性                  | 98°C    | 40 s     |
| 变性                   | 98°C    | 10 sec   |
| 退火 + 延伸 <sup>a</sup> | 65~72°C | 1 min/kb |
| 终延伸                  | 72°C    | 5 min    |

25~35 Cycles

a. 一般情况下推荐 68°C，具体可以根据 TM 值改变

在扩增长片段时，若上述常规 PCR 反应程序不能有效扩增，可尝试下表所示 Touch Down 两步法 PCR：

| 步骤  | 温度   | 时间        |
|-----|------|-----------|
| 预变性 | 95°C | 3 min     |
| 变性  | 95°C | 15 sec    |
| 延伸  | 74°C | 60 sec/kb |
| 变性  | 95°C | 15 sec    |
| 延伸  | 72°C | 60 sec/kb |
| 变性  | 95°C | 15 sec    |
| 延伸  | 70°C | 60 sec/kb |
| 变性  | 95°C | 15 sec    |
| 延伸  | 68°C | 60 sec/kb |
| 终延伸 | 68°C | 5 min     |

5 Cycles

5 Cycles

5 Cycles

5 Cycles

⚠ 注：请使用高质量的模板，若产量较低可适当提高模板的使用量，推荐使用长引物。

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司  
Monad Biotech Co., Ltd.

E-mail: support@monadbiotech.com  
Web: www.monadbiotech.com



Simply Discover More

4. 引物设计原则

- ① 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- ② 引物 3' 端应避免出现发夹结构；
- ③ 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3' 端避免有 3 个碱基以上的互补序列；
- ④ 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1℃为佳，Tm 值调整至 55~65℃为佳（引物 Tm 值推荐使用 Primer Premier 5 进行计算）；
- ⑤ 使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

注意事项

- 1. 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物和模板；使用基因组模板进行较长片段扩增需要使用高质量纯化的 DNA 模板，可以提高 PCR 成功率；
- 2. 由于 MonAmp™ 2X Hi-Fi Mix Pro 产生的 PCR 产物是平末端，如果下一步需要进行克隆，建议使用平末端克隆。如果需要 T/A 克隆，可以使用 Taq DNA 聚合酶对纯化的 PCR 产物加 dA。

常见问题

| 问题描述     | 可能原因  | 解决办法                     |
|----------|-------|--------------------------|
| 无产物或产物量少 | 退火温度  | 设置退火温度梯度，找到合适的退火温度       |
|          | 引物浓度  | 适当提高引物浓度                 |
|          | 延伸时间  | 适当增加延伸时间至 30~60 sec/kb   |
|          | 循环数   | 增加循环数至 35~40 个循环         |
|          | 模板纯度  | 使用高纯度模板                  |
|          | 模板使用量 | 使用量可参照反应体系推荐量并适量增加       |
| 有杂带或弥散条带 | 引物特异性 | 优化引物设计，提高特异性             |
|          | 退火温度  | 尝试提高退火温度并设置退火温度梯度        |
|          | 引物浓度  | 降低引物浓度至终浓度为 0.2 μM       |
|          | 延伸时间  | 有大于目标条带的杂带时可适当减少延伸时间     |
|          | 循环数   | 减少循环数至 25~30 个循环         |
|          | 反应程序  | 使用两步法或 Touch down PCR 程序 |
|          | 模板纯度  | 使用高纯度模板                  |
|          | 模板使用量 | 使用量参照反应体系推荐量调整或适当减少      |

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司  
Monad Biotech Co., Ltd.

E-mail: support@monadbiotech.com  
Web: www.monadbiotech.com



Simply Discover More