

## 产品概述

VAHTS HiFi Amplification Mix是一种新型高保真PCR扩增预混液，适用于高通量测序文库的PCR扩增。预混液基于VAHTS HiFi DNA Polymerase，该酶是由Pfu DNA Polymerase改造而成的新一代高产量高保真DNA聚合酶，灵敏度大幅提升，具有极高的扩增效率、广泛的模板适应性，极大提高了扩增产出和平台期。同时，其扩增错配率是Taq DNA Polymerase的1/52，是Pfu DNA Polymerase的1/6，保证了文库扩增的真实性。配以精心优化的缓冲体系，VAHTS HiFi Amplification Mix可以实现高通量测序文库的低偏好性、宽模板投入范围、高产量、高稳定性扩增。本品包含PCR扩增所需所有组分，并包含针对Illumina测序平台的水库扩增引物，只需加入文库模板即可进行反应，使用便捷；包含特殊的保护剂，长期存放或反复冻融后仍能保持稳定的活性。扩增产物为平端，可直接用于平端克隆。

## 产品组分

组 分	N616-01 (24 rxns)	N616-02 (96 rxns)
VAHTS HiFi Amplification Mix	600 µl	4 × 600 µl
PCR Primer Mix 3 for Illumina	120 µl	480 µl

## 保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

## 适用范围

本产品适用于VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina系列(Vazyme #ND607/ND606)，VAHTS AmpSeq Library Prep Kit V2(Vazyme #NA201)，VAHTS RNA-seq Library Prep Kit for Illumina系列(Vazyme #NR611/NR602/NR603)等建库试剂盒的水库产物再扩增。

## 注意事项

1. PCR Primer Mix 3适用于扩增含完整长度Adapter的Illumina高通量测序平台文库。
2. Library Amplification步骤严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等不良后果。

## 实验流程

### 反应体系

所有操作应于冰上进行，VAHTS HiFi Amplification Mix解冻后请上下颠倒混匀，使用后及时放回-20°C保存。

纯化过的接头连接产物	x µl
PCR Primer Mix 3 for Illumina*	5 µl
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 µl
灭菌蒸馏水	To 50 µl

\* 对于非Illumina测序平台，需换用所使用测序平台相应文库扩增引物。

## 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
热盖On	105°C		
预变性	95°C	3 min	1
变性	98°C	20 sec	} 2 - 19 <sup>c</sup>
退火	60°C <sup>a</sup>	15 sec	
延伸	72°C	30 sec <sup>b</sup>	
完全延伸	72°C	5 min	1
Hold	4°C		

a. 需根据引物Tm值调整退火温度，对于普通Illumina测序平台文库，建议设置为60°C。

b. 对于特殊长度文库，可酌情延长延伸时间。

c. 根据下表选择合适的循环数：

文库类型	起始模板使用量	产出达到1 µg所需循环数
DNA	100 pg	16 - 19
	1 ng	12 - 15
	10 ng	8 - 12
	100 ng	5 - 8
	500 ng	2 - 5
	1 µg	2 - 5
mRNA	10 ng	16 - 19
	100 ng	12 - 16
	1 µg	11 - 14

▲对于特殊文库或低质量模板所建文库，如FFPE样本所建文库、ChIP DNA文库等，循环数可根据上表增加2 - 4个循环。

## 常见问题与解决方案

### ◇ 测序平台兼容性

试剂盒中包含的PCR Primer Mix 3 for Illumina适用于Illumina测序平台；对于其他测序平台，只需换用相应文库扩增引物即可。

### ◇ 文库扩增引物浓度

对于非Illumina测序平台的文库扩增引物，建议引物浓度在10 - 20 µM范围内调整。

### ◇ 其他注意事项

- ① 建议使用纯化过的高质量文库模板，按照说明书要求操作。
- ② 对于特殊文库，如低质量文库、长片段文库，可根据反应程序中提示，调整退火温度、延伸时间和扩增循环数，以获得最佳扩增效果。
- ③ 调整延伸时间时，不宜超过1 min/kb。

\*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。