

## 2×TSINGKE® Master Mix (Green)

### ■ 目录号

TSE002

### ■ 产品简介

本产品专为聚丙烯酰胺凝胶电泳检测而设计,为2×浓度的即用型PCR预混液,已包含合适浓度的Mg<sup>2+</sup>、DNA聚合酶和dNTPs,使用时只需添加模板和引物,并补水至1×浓度即可进行反应。产品中包含上样缓冲液(预混液呈绿色),不包含核酸染料,扩增产物无需额外添加Loading Buffer即可直接用于聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。本产品扩增产物为3'端带A碱基的粘末端,若纯化后用于T/A克隆,推荐使用粘末端克隆试剂盒(目录号:TSV-007)。

### ■ 产品组成

组分	规格
2×TSINGKE® Master Mix(Green)	5×1.0 mL

### ■ 产品应用

适用于常规PCR扩增,扩增产物可用于聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### ■ 产品特点

- 高产量;
- 高效率;

- 高稳定性。

### ■ 使用方法

#### 1. 推荐PCR反应体系

组分	25 μL体系	50 μL体系	终浓度
2×TSINGKE® Master Mix(Green)	12.5 μL	25 μL	1×
10 μM上游引物 <sup>a</sup>	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
10 μM下游引物 <sup>a</sup>	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
模板DNA <sup>b</sup>	<1 μg	<1 μg	
ddH <sub>2</sub> O	Up to 25 μL	Up to 50 μL	

- a. 引物终浓度范围为0.2~0.8 μM, 本产品推荐使用0.2 μM, 过少的引物会导致扩增失败或产量低, 过量的引物可能导致非特异性扩增, 可根据实际情况适当调整用量。
- b. 过量的模板会导致非特异性扩增, 过少的模板易导致PCR扩增效率低, 正式扩增前可进行模板梯度预试验, 得到最合适的模板用量。

#### 2. 推荐PCR反应程序

##### 1) 常规程序推荐:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	2~5 min	1
变性	94°C	30 s	30~35 <sup>c</sup>
退火 <sup>a</sup>	T <sub>m</sub>	30 s	
延伸 <sup>b</sup>	72°C	30~60 s/kb	
终延伸	72°C	5~10 min	1
保存	4~12°C	∞	

a. 退火温度:参考引物Tm值,选择上下游引物Tm的平均值为退火温度,如扩增产物特异性较差,或上下游引物Tm值相差较大,可在 $Tm \pm 5^{\circ}C$ 范围内做退火温度梯度预实验,得到最适退火温度。

b. 延伸时间:常规模板推荐设置为30 s/kb,对于含扩增抑制物的模板或困难模板,可以将延伸时间设置为1 min /kb。

c. 循环数:30个循环可满足大部分扩增需要,若想获得更多产物,可增加循环数至35-40个。

## 2) 困难模板程序推荐:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	96°C	2 min	1
变性	96°C	10 s	30~35*
退火 <sup>a</sup>	Tm	30 s	
延伸 <sup>b</sup>	72°C	30~60 s/kb	
终延伸	72°C	5~10 min	1
保存	4~12°C	∞	

## 3. 扩增产物鉴定

扩增产物可直接进行PAGE电泳或琼脂糖凝胶电泳,无需添加Loading Buffer。

## ■ 注意事项

- 使用前, Mix解冻后应充分混匀。
- PCR Mix应避免反复冻融, 短期内多次使用可置于2-8°C保存。

## ■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
无产物或产物量少	引物退火效率低	重新设计引物或从5'端加长引物
	退火温度不合适	设置退火温度梯度(推荐以2°C为梯度), 得到合适的退火温度
	引物浓度过低, 引物降解	适当增加引物用量或重新合成引物
	延伸时间过短	增加延伸时间至1 min/kb
	循环数过低	增加循环数至35-40个循环
	模板降解或用量不合适	确保模板质量良好, 同时可根据模板种类设置用量梯度, 得到最合适的用量
存在非特异性扩增或条带弥散	引物特异性差	重新设计高特异性引物
	退火温度不合适	设置退火温度梯度(推荐以2°C为梯度), 得到合适的退火温度
	延伸时间过长或过短	可根据非特异条带大小调整延伸时间, 若杂带小于目的片段, 可适当增加延伸时间, 若杂带大于目的片段, 可适当减少延伸时间
	循环数过高	适当降低循环数
	模板用量过多	减少模板用量或将模板稀释10倍后扩增
阴性对照扩增出条带	环境或气溶胶污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSPO01)对操作环境及空气进行清洁处理
	PCR体系污染	使用无菌耗材, 及时更换枪头

## ■ 保存条件

-25~-15°C保存, 保质期2年, 干冰运输。

## ■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:  
product@tsingke.com.cn。

