

2×TSINGKE® Master Mix

■ 目录号

TSE003

■ 产品简介

本产品中包含的Taq DNA Polymerase经过抗体修饰,可防止反应体系配制过程中或扩增反应开始前产生非特异性扩增和引物二聚体,具有极高的科学严谨性,只需94°C加热1分钟即可释放酶活,且兼容现有的PCR程序。

本产品为2×浓度的即用型PCR预混液,已包含合适浓度的Mg²⁺、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。扩增完成后,可取适量扩增产物与Loading Buffer按比例混合后,进行电泳检测。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	5×1.0 mL

■ 产品应用

适用于常规PCR、热启动PCR。

■ 产品特点

- 高特异性:抗体修饰的热启动酶,有效减少非特异性扩增、引物二聚体的产生;
- 高稳定性:优化的反应缓冲液,扩增稳定性良好;
- 高产量:扩增高效,单位时间内获得更多的DNA。

■ 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	12.5 μL	25 μL	1×
10 μM上游引物 ^a	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
10 μM下游引物 ^a	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
模板DNA ^b	<1 μg	<1 μg	
ddH ₂ 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°
退火 ^a	T _m	30 s	
延伸 ^b	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T_m值,选择上下游引物T_m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T_m值相差较大,可在T_m±5°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 ^a	T _m	30 s	
延伸 ^b	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

取适量扩增产物与Loading Buffer按比例混合后,进行电泳检测。

■ 注意事项

- 使用前, PCR 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4°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: TSP001)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。

