

2×TSINGKE® Master Mix (Blue)

■ 目录号

TSE004

■ 产品简介

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。产品中包含上样缓冲液（预混液呈蓝色），不包含核酸染料，扩增产物无需额外添加Loading Buffer即可直接点样电泳。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(Blue) | 5×1.0 mL |

■ 产品应用

适用于常规PCR扩增。

■ 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(Blue) | 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 ^c |
| 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试验,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 ^a | Tm | 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

扩增产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳,无需添加Loading Buffer。

■ 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

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。

