

2×T5 Super PCR Mix (Colony)

■ 目录号

TSE005

■ 产品简介

本产品为2×浓度的快速扩增PCR预混液，产品中所含的T5 DNA Polymerase是新型DNA聚合酶，由经过改造的Taq DNA聚合酶融合Sso7d DNA-Binding结构域而来，具有极高的扩增速度与稳定性。反应缓冲液针对菌落/菌液PCR优化，适合各种微生物来源的模板，是PCR鉴定实验的理想选择。

本产品包含合适浓度的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，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3'端为粘末端，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×T5 Super PCR Mix (Colony)	5×1.0 mL
5×Enhancer Buffer	2×1.0 mL

■ 产品应用

适用于克隆鉴定、以微生物为模板的直接扩增、常规模板扩增等实验。

■ 产品特点

- 超快的延伸速度：10 s/kb；
- 极强的耐热性：98°C热处理1 h酶活性无明显变化；
- 优异的稳定性：优化的反应缓冲液，扩增高效、稳定。

■ 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×T5 Super PCR Mix (Colony)	12.5 μL	25 μL	1×
10 μM上游引物 ^a	1 μL	2 μL	0.4 μM
10 μM下游引物 ^a	1 μL	2 μL	0.4 μM
模板DNA ^b	见标注	见标注	
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，推荐使用0.4 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. 模板

菌液：吸取1~3 μL菌液为模板；

菌落：挑取单菌落置于反应液中，或将菌落溶解于10~20 μL无菌水中，吸取1~2 μL为模板；

常规基因组DNA：50~250 ng；

简单模板（质粒、λDNA等）：5 pg~50 ng。

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。

c. 试剂盒中配有5×Enhancer Buffer，在扩增长片段、高GC片段（片段整体或局部GC含量>65%），以及出现较多非特异扩增而提高退火温度不能消除时添加，可有效改善扩增效果。使用时终浓度调整为1×，如50 μL体系中需加入10 μL本组分。

2. 推荐PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98°C	2~5 min	1
变性	98°C	10 s	30~35 ^d
退火 ^b	Tm+3~5°C	10~15 s	
延伸 ^c	72°C	10~15 s/kb	
终延伸	72°C	2 min	1
保存	4~12°C	∞	

a. 预变性：建议采用98°C，时间一般设置为2 min即可，菌落/菌液PCR可延长至5 min，以促进细胞裂解进而释放DNA。

b. 退火温度：参考引物Tm值，建议设置为引物中Tm较小值+3~5°C；如扩增产物特异性较差，或上下游引物Tm值相差较大，可先进行退火温度梯度预试验以得到最适退火温度，或尝试用Touchdown PCR程序进行扩增。

c. 延伸时间：常规模板推荐设置为10~15 s/kb，对于含扩增抑制剂、难扩增模板、或需更高产量等的扩增，可以将延伸时间增加至20~30 s/kb。

d. 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。

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

· 若模板为基因组DNA等常规模板，可能出现较多非特异扩增，通过添加5×Enhancer Buffer可有效改善该现象。

· 若样品为革兰氏阳性菌、真菌等难裂解样品时，可通过碱裂解等方法进行样品预处理，以促进DNA释放，提高扩增成功率。

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

■ 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30 s/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
样品难裂解，未释放出足量DNA	对样品进行预处理以促进DNA释放，如煮沸裂解、碱裂解、溶菌酶预处理等	

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
阴性对照扩增出条带	模板用量过多	减少模板用量或将模板稀释后扩增
	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

■ 应用实例

1. 大肠杆菌为模板的菌落/菌液PCR

注意：若以菌落为模板，可使用牙签或枪头挑取单菌落后插入反应液内摇晃或吹打数次取出。若以菌液为模板，推荐用量为1~5 μL过夜培养菌液（50 μL体系），菌液体积不超过反应体系体积的1/10。

A. 以含有T载体（分别插入1 kb、5 kb目的片段）的DH5α菌株为模板，各挑取5个菌落进行菌落PCR。

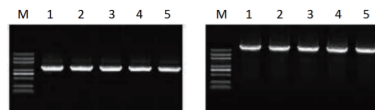
PCR反应体系：

组分	50 μL体系
2×T5 Super PCR Mix (Colony)	25 μL
10 μM M13-47引物	2 μL
10 μM M13-48引物	2 μL
模板DNA	2 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

PCR反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 s	30
55°C	10 s	
72°C	10 s/kb	
72°C	2 min	1
4°C	∞	

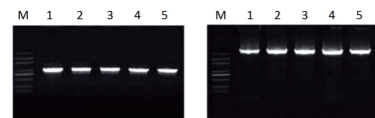
PCR扩增结果:



插入片段大小为1 kb

插入片段大小为5 kb

B. 以含有pET28a载体(分别插入1 kb、5 kb目的片段)的BL21(DE3)菌株,各挑取5个菌落进行菌落PCR。PCR扩增结果如下图:



插入片段大小为1 kb

插入片段大小为5 kb

06

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2. 土壤农杆菌(A.tumefaciens)菌液PCR

模板处理:10 μL菌液+30 μL NaOH溶液(25 mM),98°C热处理10 min。

引物:27F/1492R,以E.coli菌液为阳性对照。

PCR反应体系:

组分	50 μL体系
2×T5 Super PCR Mix (Colony)	25 μL
10 μM 27F引物	2 μL
10 μM 1492R引物	2 μL
模板DNA	1~3 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

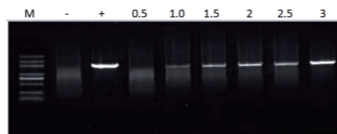
PCR反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 s	30 cycles
55°C	10 s	
72°C	20 s	
72°C	2 min	1
4~12°C	∞	

PCR扩增结果:

07

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

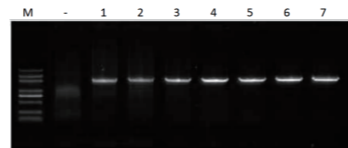


“-/+”分别为阴性、阳性对照,从左至右模板量依次增加

3. 苏云金芽胞杆菌(B.thuringiensis)菌液PCR

模板处理:挑取适量菌落+30 μL NaOH溶液(25 mM),98°C热处理10 min,

取1~5 μL裂解产物(50 μL体系)为模板进行扩增,结果如下图:

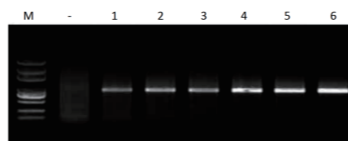


“-”为阴性对照,“1-7”为不同菌落样品

4. 毕赤酵母菌株(P.Pastoris KM71)菌液PCR

模板处理:10 μL酵母菌液+30 μL NaOH溶液(25 mM),98°C热处理10 min,

取1 μL裂解产物(50 μL体系)为模板进行扩增,引物为Y1-F/R。扩增结果如下图:



“-”为阴性对照,“1-6”为不同菌落样品

08

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 保存条件

-25~-15°C保存,保质期2年,干冰运输。

■ 技术支持

本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。

09

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。



网址:www.tsingke.com.cn
地址:湖北省鄂州市葛店开发区东湖高新智慧城7栋

10

1.1.2.20211110