

2×T5 Super PCR Mix (PAGE)

■ 目录号

TSE006

■ 产品简介

本产品专为短串联重复序列的扩增而设计,适用于1 kb以内片段的扩增。产品采用了独特的双组分DNA聚合酶,即改造的T5 DNA Polymerase及只有3'-5'核糖外切酶活性的T6 DNA Polymerase,其中前者在野生型Taq DNA聚合酶的DNA聚合酶活性区域543、615、660、664、680、681等氨基酸位点进行了突变改造,提高了对粗模板的耐受能力及对高GC模板的扩增能力,降低了dNTPs的掺入效率以保证重复序列处扩增的准确性,同时融合具有持续合成能力的DNA结合结构域Sso7d,大幅度提高了反应速度及稳定性,配合精心优化的缓冲体系,既解决了多重序列扩增时容易产生插入/缺失突变的问题,同时又具有高保真的优点,保真度为野生型Taq DNA聚合酶的6倍。

本产品为2×浓度的快速扩增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,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'端为平末端。

■ 产品组成

组分	规格
2×T5 Super PCR Mix (PAGE)	5×1.0 mL

■ 产品应用

适用于短串联重复序列的扩增,也可用于其他短片段的扩增。

■ 产品特点

- 高度识别短串联重复序列:在短串联重复序列处不产生插入/缺失突变;
- 超快的延伸速度:快速扩增型T5 DNA Polymerase,延伸速度为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 (PAGE)	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	<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,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. 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

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

a. 退火温度: 参考引物T_m值, 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以得到最适退火温度。

b. 延伸时间: 常规模板推荐设置为10 s/kb, 对于含扩增抑制物的模板, 可以将延伸时间增加至20~30 s/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。

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

- 本产品不推荐用于长片段扩增。
- 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
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10倍后扩增
	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

■ 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。

