

T5 Direct PCR Kit(Plant)

目录号

TSE011

产品简介

本产品是一款专为叶片、种子等植物样品直接扩增设计的试剂盒,适用于2 kb以内DNA片段的扩增。植物样品经过简单的裂解处理即可作为PCR扩增模板,无需进行基因组DNA的提取,使用更加简便。产品中所含的T5 Plant DNA Polymerase,是在具有校正活性的高保真DNA聚合酶基础上改造而来,特殊的DNA-Binding结构Sso7d蛋白结构域的融合使其具有超快的延伸速度,同时基于*lacZα*法测试,该酶的保真度为野生型*Taq* DNA聚合酶的20倍。产品中特别添加特异性增强因子SuperPrime及延伸增强因子Extension Enhancer,显著提高了扩增产量与特异性,优化的反应缓冲液可减少扩增条件探索,极大地节省时间。

本产品为2×浓度的PCR直扩预混液,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。使用本试剂盒扩增的产物为平末端,纯化后可用于后续克隆(推荐T载体目录号:T5V-007B)、酶切、测序及文库构建等实验。

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

产品组成

组分	规格
2×T5 Direct PCR Mix (Plant)	5×1.0 mL
Lysis Buffer A	1×10 mL
Dilution Buffer B	1×10 mL
Positive Control Primer Mix (Rbcl) (10 μM each)	100 μL

产品应用

适用于植物样品的直接扩增,可用于植物基因敲除分析、转基因检测等鉴定型实验,同时适用于对保真性要求较高的基因克隆等实验。

产品特点

- 无需提取基因组DNA,操作简便,省时省力;
- 改造的T5 Plant DNA Polymerase,具有极高的抑制物耐受度,保真度为野生型*Taq* DNA聚合酶的20倍;
- 快速扩增,延伸速度高达10 s/kb;
- 适用于多种植物的叶片、种子等样品。

使用方法

1. 基因组DNA的释放

取直径1~2 mm的植物样品,放入离心管内并加入50 μL Lysis Buffer A, 95°C加热10 min(较难裂解的样品可适当增加裂解时间),瞬时离心,取上清液1~3 μL为模板进行PCR扩增(杂质含量较高时,可取适量上清液与等体积的Dilution Buffer B混匀后,取1~3 μL为模板进行PCR扩增)。

注:对于植物种子等难以裂解或比较坚硬的样品,可提前通过液氮研磨或捣

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

碎等方法进行预处理,帮助DNA更好的释放。裂解操作中需确保样品完全浸入到裂解液中,而非粘在管壁上。



植物叶片推荐取样量示意图

2. 推荐PCR反应体系

将2×T5 Direct PCR Mix (Plant)从-20°C取出后置于冰上解冻,完全解冻后上下颠倒混匀。按照如下方法配制反应体系:

组分	50 μL体系	终浓度
2×T5 Direct PCR Mix (Plant)	25 μL	1×
上游引物(10 μM) ^a	2 μL	0.4 μM
下游引物(10 μM) ^a	2 μL	0.4 μM
裂解产物 ^b	1~3 μL	
灭菌水	Up to 50 μL	

注:各组分使用前应充分混匀,体系配制完成后,应充分混匀并短暂离心后上机。

- 引物:为提高产物特异性与扩增成功率,建议引物Tm值为65~70°C,长度为25 bp以上;扩增效果不佳时,可在0.2~0.8 μM范围内调整引物终浓度;
- 裂解产物:加入量过高时,抑制物会影响扩增效果。可在正式实验前先行模板量梯度扩增预试验,挑选出最合适的模板量。

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

3. 推荐PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 s	35~40 ^c
退火 ^c	Tm+3~5°C	10 s	
延伸 ^b	72°C	10~30 s/kb	
终延伸	72°C	3~5 min	1
保存	4~12°C	∞	

- 退火温度:参考引物Tm值,建议退火温度设置为引物中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;
- 延伸时间:简单模板按照10 s/kb设置即可,对于高GC等复杂模板,可将延伸速度调整为20~30 s/kb,以保证较高的扩增效率及产量;
- 扩增循环数:通常来说,35个循环可扩增足量产物,若扩增产量偏低,可增加循环数至40。

4. 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。

5. 阳性对照引物

试剂盒内包含引物预混液Positive Control Primer Mix (Rbcl)(10 μM each),可用于阳性对照反应。

阳性对照引物为Rbcl-F/R,可从维管植物基因Rbcl序列中扩增出长为650 bp的片段。

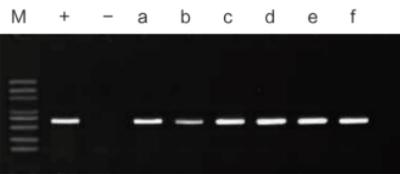
阳性对照引物扩增时推荐使用退火温度范围为55~60°C。

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

引物名称	引物序列
RbcL-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
RbcL-R	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT

几种植物样品的阳性对照引物扩增产物电泳检测结果



M: DL5000 DNA Marker; +: 阳性对照, 以拟南芥总DNA为模板;

-: 阴性无模板对照;

a: 烟草; b: 水稻; c: 小麦; d: 玉米; e: 棉花; f: 松。

a~f均为取1~2 mm相应植物的叶片, 采用加热裂解法处理样品, 取1 μL上清液为模板的扩增结果。

■ 注意事项

- 为避免样品间出现交叉污染, 需准备多个取样工具, 如需反复使用可在每次取样后用2%次氯酸钠溶液或Trelief® Solution核酸清洁液(目录号: TSP001)对工具表面进行清洁处理, 确保每一单独样品均使用无污染的取样器材;
- 建议使用新鲜的植物样品, 尽量避免因长期储存或反复冻融导致的基因组DNA的降解。取样量不宜过大, 以避免影响扩增结果;
- 为保证实验效果, 建议每次扩增均使用新鲜裂解产物为模板;
- PCR Mix应避免反复冻融, 短期内多次使用可置于2~8°C保存。

05

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
阳性对照片段、目的片段均无扩增	裂解产物过量	可在正式实验前先行进行模板梯度扩增, 选择最合适的模板用量, 一般不超过体系的1/10
	取样量过大, 模板杂质含量高	将裂解产物稀释10倍后扩增, 或减少取样量重新裂解
	组织样品不新鲜	建议使用新鲜的组织样品, 避免长期储存或反复冻融导致的基因组DNA的降解
	试剂保存不当	使用新的试剂盒, PCR Mix长期保存应在-25~-15°C, 使用时应避免反复冻融
	引物质量差	做纯化的基因组模板的对照反应, 验证引物质量, 若仍然无法扩增可重新设计合成引物
阳性对照片段扩增正常, 目的片段无条带或条带弱	操作失误	重复实验, 确认操作、循环参数无误
	引物质量差	做纯化的基因组模板的对照反应, 验证引物质量, 若无法正常扩增可重新设计合成引物
	退火温度不合适	做退火温度梯度PCR(推荐以2°C为梯度), 摸索最佳反应条件
	延伸时间过短	增加延伸时间
非特异性扩增	循环数过低	增加5~10个循环数
	DNA模板量不足	适当增加模板用量
	退火温度过低	提高退火温度或尝试Touchdown PCR程序
	延伸时间过久	缩短延伸时间(非特异条带大于目的片段时适用)
	循环数过高	减少循环数
	模板用量过高	减少模板用量或将模板稀释后扩增
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
引物特异性差	适当延长引物或重新设计引物	

06

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

产物呈现高/低分子量弥散条带	退火温度不合适	做退火温度梯度PCR(推荐以2°C为梯度), 摸索最佳反应条件
	模板用量不合适	可在正式实验前先行进行模板梯度扩增, 选择最合适的模板用量, 一般不超过体系的1/10
	循环数过高	减少循环数
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	延伸时间过久	适当缩短延伸时间(高分子量弥散条带适用)
阴性对照扩增出目的条带	体系杂质含量高	电泳前离心取上清(低分子量弥散条带适用)
	引物质量差	重新设计引物(低分子量弥散条带适用)
	样品间交叉污染	每个取样器只取一个样品, 或取完后用2%次氯酸钠溶液或Trelief® Solution核酸清洁液(目录号: TSP001)对工具表面进行清洁处理
	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。

07

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。



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

08



11.2.20211110