

1.1×T3 Super PCR Mix

■ 目录号

TSE030

■ 产品简介

本产品为即用型快速扩增PCR预混液,其中包含的T3 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,保真度是普通Taq DNA聚合酶的3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,扩增产量与特异性均显著提高,优化的反应缓冲液可减少扩增条件探索,极大地节省时间。

本产品包含DNA polymerase、dNTP以及优化的反应缓冲液,浓度为1.1×,使用时无需额外添加双蒸水补充体系,只需加入引物和模板即可进行扩增。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'端为混合末端,若纯化后用于T/A克隆,推荐使用平末端克隆试剂盒(目录号:TSV-007B)。

■ 产品组成

组分	规格
1.1×T3 Super PCR Mix	10×1.125 mL

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品应用

适用于常规PCR/高通量PCR。

■ 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	终浓度
1.1×T3 Super PCR Mix ^a	18~22 μL	1×
10 μM上游引物 ^b	1 μL	0.4 μM
10 μM下游引物 ^b	1 μL	0.4 μM
模板DNA ^c	1~5 μL	

a. 当需要加入较多的模板时,可相应调整本产品用量,但本产品占比不可低于总体系的70%,Mix含量过低会降低扩增效率。

b. 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极低,过量的引物可能会增加错配的可能性,导致非特异性扩增,可根据实际情况适当调整用量。引物长度一般为20~40bp,GC含量以40~60%为宜。

c. 模板推荐量

基因组DNA:50~250 ng;

质粒、病毒DNA:1 pg~10 ng;

cDNA:推荐将反转录产物原液稀释5~10倍后,取1 μL作为模板。

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

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

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

a. 预变性及变性:推荐温度为98°C,预变性时间2 min即可满足大部分实验要求,过长的变性时间容易导致dNTP品质改变, DNA模板胞嘧啶脱氨等不良效应。

b. 退火温度:T3 DNA Polymerase需较高的退火温度;同时SuperPrime因子赋予扩增更多的自由度,免除了Tm值设置的烦忧,如下表,通常仅3个退火值就可满足多数实验需求,避免反复更改带来的繁琐与混乱;其他情况也可通过预试验得到最佳退火温度。

引物Tm值(°C)	推荐退火温度(°C)
48~55	55
55~65	60
>65	65

c. 延伸时间:常规模板推荐设置为10~15 s/kb,对于含扩增抑制物、难扩增模板或需更高的产量等的扩增,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。

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

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

- 产品不推荐用于菌落和菌液PCR, 如有需要推荐使用我公司菌P专用PCR Mix (目录号: TSE005)。
- 扩增脏模板时, 可通过“稀释模板, 增加循环数”或“减少模板量, 扩大体系”两种方案来提高扩增成功率。
- 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: 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。

