达领生物

GoldenStar® T6 Super PCR Mix (1.1×) 金牌Mix (Green)

目录号

DLP202

产品简介

本产品为即用型快速PCR预混液，其中包含的DNA Polymerase由基因工程改造GoldenStar® T6 DNA Polymerase所得，该聚合酶由*Pyrococcus*酶与一种具有增强持续合成能力的结构域融合而成，其扩增错配率是野生型*Taq* DNA聚合酶的1/30。本产品同时具有5'→3' DNA聚合酶活性和3'→5'外切酶活性，扩增产物为平末端，若纯化后用于TA克隆，推荐使用平末端克隆试剂盒（目录号：DLV101）。

本产品包含DNA Polymerase、dNTPs以及优化的反应缓冲液，浓度为1.1×，使用时无需额外添加ddH_2O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与电泳指示剂，不含核酸染料，扩增产物无需额外添加Loading Buffer即可直接电泳。

产品组成

组分	规格
金牌Mix（Green）	5×1.125 mL

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

产品应用

适用于基因克隆等对保真性要求较高的实验。

产品特点

- 高保真性：普通*Taq* DNA聚合酶的30倍；
- 快速延伸：10 s/kb；
- 强耐热性：98°C热处理1 h无明显活性变化。

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
金牌Mix（Green）	20~22 μL	43~45 μL	1×
10 μM 上游引物	1 μL	2 μL	0.4 μM
10 μM下游引物	1 μL	2 μL	0.4 μM
模板DNA[a]	1~3 μL	1~3 μL	

a. 模板推荐量

试剂盒提取的基因组DNA：50~500 ng；

CTAB法提取的基因组DNA：100~500 ng；

质粒、噬菌体：0.05~1 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。

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

2. 推荐PCR反应程序

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

b.预变性：扩增较长的片段时，建议使用95°C 5 min预变性处理防止对DNA造成额外的损伤；

c.退火温度：参考引物Tm值，最适退火温度与引物间的平均Tm值相近，若引物间Tm值偏差较大，建议退火温度设置为引物中Tm较小值+1~2°C；

退火时间：对于含兼并引物、复杂模板的扩增，建议退火时间延长至30 s；

d.延伸温度：通常为72°C，可根据实际需求在68~75°C范围内调整；

延伸时间：常规模板推荐设置为10~15 s/kb，复杂模板可以将延伸时间增加至20~30 s/kb；略微增加延伸时间有利于提高长片段、低浓度、复杂模板的PCR产量，但总延伸时间不超过30 s/kb；

e.循环数：30个循环可满足大部分扩增需要，循环数过多易导致非特异性扩增增加，但若扩增条带较弱，可将循环数增加至35~40个。PCR需要的理论循环数如下表：

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

近似循环数 / 模板拷贝数 / 扩增效率	1	10	100	1000	10000
1	38	35	32	28	25
0.95	40	36	33	30	26
0.9	42	38	34	31	27
0.85	43	40	36	32	28
0.8	45	41	37	34	30
0.75	48	43	39	35	31
0.7	50	46	42	37	33

上表列出了在不同的PCR扩增效率和不同初始拷贝数条件下，要获得200 ng 500 bp的PCR产物所需的循环数。从表可知模板浓度降低10倍，需要增加至少4个循环。

注意事项

- 请使用高质量模板；
- 请勿使用dUTP和含有尿嘧啶的引物与模板，尿嘧啶对高保真酶存在毒性作用；
- 本产品不推荐用于脏模板扩增，菌落和菌液PCR推荐使用T5菌P专家（目录号：DLP102）。
- 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。

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

应用实例

1.长片段扩增（>3 kb）

要点：延伸时间

PCR反应体系：

组分	50 μL体系
金牌Mix (Green)	45 μL
10 μM Primer F	2 μL
10 μM Primer R	2 μL
100 ng/μL Template DNA	1 μL

PCR反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	5 min	1
98°C	10 s	10
Tm	10 s	
72°C	10 s/kb	
98°C	10 s	10
Tm	10 s	
72°C	20 s/kb	
98°C	10 s	10
Tm	10 s	
72°C	30 s/kb	
72°C	1 min	1
4~12°C	∞	

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

2. 若常规PCR扩增效果不佳，可尝试Touchdown PCR程序

要点：退火温度

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 s	-1°C/cycle 10 cycles
Tm+5°C	30 s	
72°C	10 s/kb	
98°C	10 s	25
Tm-5°C	30 s	
72°C	10 s/kb	
72°C	1 min	1
4~12°C	∞	

3.低浓度模板与简单模板的扩增

要点：低浓度模板扩增可提高循环数（如：40个循环）；以质粒、PCR产物等简单模板扩增时，需稀释模板（如：稀释浓度至10 pg/μL~1 ng/μL）并提高退火温度（如Tm+2~5°C）。

保存条件

-25~-15°C保存，保质期2年。≤0°C运输。

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
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

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

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。

关联产品推荐

产品名称	货号	应用
FlashPure 快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1~5 mL菌液质粒DNA快速提取
DNA凝胶回收试剂盒（安全便捷型）	DLN801	适用于从琼脂糖凝胶或PCR产物中回收多至10 μg DNA
pClone007通用型TA克隆试剂盒	DLV103	适用于平、黏末端TA克隆
Trelief ®无缝克隆试剂盒	DLV201	适用于无缝克隆与定点突变等实验
Trelief ® 5α感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验

地址：鄂州市葛店开发区建设大道216号东湖高新智慧城7栋

1.1.1P202.2411