



2× T5 Super PCR Mix (Colony) T5菌P专家

目录号

DLP102

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-Bind-ing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，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TA克隆，推荐使用粘末端TA克隆试剂盒（目录号：DLV102）。

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：快速扩增型T5 DNA Polymerase，延伸速度达10 s/kb；
- 极强的耐热性：98℃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	1 μL	2 μL	0.4 μM
10 μM下游引物	1 μL	2 μL	0.4 μM
模板DNA ^a	见标注	见标注	
ddH ₂ O	Up to 25 μL	Up to 50 μL	

a.模板推荐量：

菌液，推荐用量为1~3 μL；

菌落，推荐直接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，推荐用量为50~250 ng；

质粒与λDNA等简单模板，推荐用量为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。

2.推荐PCR反应程序

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

a.预变性：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.延伸时间：延伸速度为10~15 s/kb时可以满足大部分模板扩增需要，若模板为复杂模板或者模板纯度较低，可以将延伸时间增加至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℃保存。使用前，Mix解冻后应充分混匀。

应用实例

1.大肠杆菌为模板的菌落/菌液PCR

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。

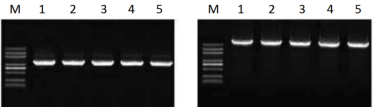
PCR反应体系：

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℃	2 min	1
98℃	10 s	30
55℃	10 s	
72℃	10 s/kb	1
72℃	2 min	
4℃	∞	

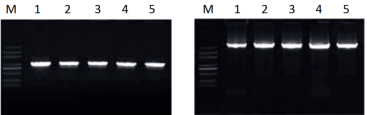
PCR扩增结果：



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:

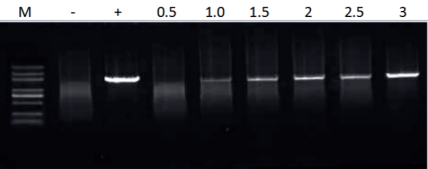


插入片段大小为1 kb

插入片段大小为5 kb

2.土壤农杆菌(A.tumefaciens)菌液PCR

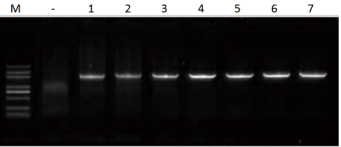
模板处理:10 μL菌液+30 μL NaOH溶液(25 mM),98°C热处理10 min,取1~3 μL裂解产物(50 μL体系)为模板进行扩增,结果如下图:



"-/+ "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

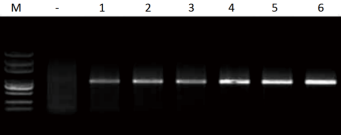
模板处理:挑取适量菌落+30 μL NaOH溶液(25 mM),98°C热处理10 min,取1~5 μL裂解产物(50 μL体系)为模板进行扩增,结果如下图:



"-"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

保存条件

-25~-15°C保存,保质期2年,<=0°C运输。

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	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、溶菌酶处理等
	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

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
T载体菌检试剂	DLP601	适用于TA克隆菌落鉴定实验
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	DLV201-20	适用于无缝克隆与定点突变等实验
Trelief®5a感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验

扫码关注

达赖生物

抖音

微信公众号

小红书

