



金牌Mix(green) Golden Star T6 Super PCR Mix(1.1x)

■ 目录号:

TSE101

■ 产品组成:

Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1x) 5x1.125 mL

■ 产品说明:

金牌Mix(green)为即用型快速PCR预混液,其浓度为1.1x。本产品含DNA polymerase、Buffer、dNTPs等组分,只需添加引物和DNA模板即可进行PCR扩增。扩增完成后可直接上样,进行电泳检测。

本产品所含的DNA polymerase是由基因工程改造的Golden Star T6 DNA polymerase,使用本产品扩增得到的PCR产物为平末端。

■ 产品特点:

- 超快的延伸速度(5~10 s/kb)
- 超高的耐热性能(98°C热处理1 h无明显活性变化)
- 极强的扩增能力及保真性

■ PCR反应体系:

	25 μ L Reaction	50 μ L Reaction	Final Concentration
金牌Mix(green) ^a	22 μ L	45 μ L	1 X
10 μ M Primer F ^b	1 μ L	2 μ L	0.4 μ M
10 μ M Primer R ^b	1 μ L	2 μ L	0.4 μ M
Template DNA ^c	as required	as required	see notes

a: 金牌Mix(green)推荐用量是45 μ L /50 μ L体系; 金牌Mix(green)用量至少占总反应体积的85%。

b: 引物的终浓度范围是0.2~0.8 μ M, 推荐0.4 μ M, 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。

c-1: 对于质粒或噬菌体DNA, 推荐量为0.05~1 ng;

对于基因组, 推荐量为50~500 ng;

对于cDNA, 推荐稀释5~100倍, 取1 μ L作为模板。

过量的模板容易导致非特异性扩增, 过少的模板容易导致PCR扩增效率低。

c-2: 勿使用含尿嘧啶的引物或模板, 尿嘧啶对高保真酶存在毒性作用。

c-3: 本产品不推荐用于脏模板扩增, 菌落和菌液PCR推荐使用我公司菌P专用PCR Mix(货号:TSE005)。

■ PCR反应程序:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation ^a	98°C	2 min	1
Denaturation ^a	98°C	10 s	30~35
Annealing ^b	$T_m \pm 5^\circ\text{C}$	10~15 s	
Extension ^c	72°C	5~15 s/kb	
Final Extension	72°C	1~5 min	1
	4°C	Hold	

a: 扩增>5 kb的产物时, 建议使用95°C 5 min预变性处理, 防止对DNA造成额外的损伤。

b-1: 最适 T_m 与引物间的平均温度相近, $50^\circ\text{C} \leq T_m \leq 68^\circ\text{C}$ 。若引物间 T_m 值偏差较大, 最适 T_m 用引物的最低 $T_m + 1\sim 2^\circ\text{C}$ 。

b-2: 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。

c: 延伸时间:

适合的延伸温度: 68~75°C;

推荐的延伸速度: 10~15 s/kb;

质粒等简单模板: 5~10 s/kb;

常规基因组模板: 10~15 s/kb;

复杂模板: 15~25 s/kb;

略微增加延伸时间(5~10 s/kb)有利于提高长片段、低浓度、复杂模板的PCR产量, 但总延伸时间不要超过30 s/kb。

d: PCR需要的理论循环数:

近似的循环数 扩增效率	模板拷贝数				
	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扩增效率和不同的初始拷贝数条件下, 要获得200 ng 500 bp的PCR产物所需的循环数。从图可知模板浓度降低10倍, 需要增加最少4个循环。

e: 若常规PCR扩增效果不佳, 可尝试Touchdown程序:

98°C	2 min	} -1°C/cycle 10 cycles
98°C	10 s	
$T_m + 5^\circ\text{C}$	30 s	
72°C	10 s/kb	} 25 cycles
98°C	10 s	
$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s	
72°C	10 s/kb	}
72°C	1 min	

应用实例:

1. 常规扩增:

PCR反应体系:

Component	50 μ L Reaction
金牌Mix(green)	45 μ L
10 μ M Primer F	2 μ L
10 μ M Primer R	2 μ L
100 ng/ μ L Template DNA	1 μ L

PCR反应程序:

98°C	2 min	} 30 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	10 s/kb	
72°C	1 min	

2. 低浓度模板的扩增:

要点: 循环数及金牌Mix的含量

方案1: 低模板量, 多循环数

PCR反应程序:

Component	50 μ L Reaction
金牌Mix(green)	45 μ L
10 μ M Primer F	2 μ L
10 μ M Primer R	2 μ L
Template DNA	1 μ L

PCR反应程序:

98°C	2 min	} 40 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	10 s/kb	
72°C	1 min	

方案2: 高模板量, 少循环数 (保证金牌Mix占总体系90%以上。)

PCR反应体系:

Component	77 μ L Reaction
金牌Mix(green)	63 μ L
10 μ M Primer F	2 μ L
10 μ M Primer R	2 μ L
Template DNA	10 μ L

PCR反应程序:

98°C	2 min	} 35 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	10 s/kb	
72°C	1 min	

3. 简单模板的扩增: 以cDNA、质粒、PCR产物等为模板的扩增

要点: 微量模板及高T_m值, 务必对模板进行稀释

PCR反应体系:

Component	50 μ L Reaction
金牌Mix(green)	45 μ L
10 μ M Primer F	2 μ L
10 μ M Primer R	2 μ L
10 pg/ μ L ~ 1 ng/ μ L Template DNA	1 μ L

PCR反应程序:

98°C	2 min	} 30 cycles
98°C	10 s	
T _m + 2 ~ 5°C	10 s	
72°C	5 ~ 10 s/kb	
72°C	1 min	

4. 长片段扩增(>5 kb)

要点: 延伸时间

PCR反应体系:

Component	50 μ L Reaction
金牌Mix(green)	45 μ L
10 μ M Primer F	2 μ L
10 μ M Primer R	2 μ L
100 ng/ μ L Template DNA	1 μ L

PCR循环程序:

95°C	5 min	} 10 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	10 s/kb	} 10 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	20 s/kb	} 10 cycles
98°C	10 s	
T _m	10 s	
72°C	30 s/kb	} 10 cycles
72°C	1 min	

保存条件: -20°C保存2年。4°C保存3个月未检测出PCR性能或酶活性的下降。本产品完全融解后请于4°C保存, 避免反复冻融, 使用时需颠倒混匀。