

2.5×TFS Master Mixture

目录号: T666123 (1 mL)

保存条件: -20℃, 尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	1 mL
2.5×TFS Master Mixture	1 mL
ddH ₂ O	1 mL

产品简介

2.5×TFS Master Mixture 是一款适用于各种类型多重 PCR 的预混体系, 浓度为 2.5×, 包含 DNA 聚合酶、PCR Buffer、dNTPs、Mg²⁺以及稳定剂和增强剂等成分, 操作简便快速。

2.5×TFS Master Mixture 包含的 DNA 聚合酶是一种经基因工程改造的重组酶, 具有 5'→3'DNA 聚合酶活性, 无 5'→3'外切酶活性; DNA 聚合酶经过新型抗体修饰, 为抗体修饰热启动酶, 能够有效减少在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 同时具有激活时间短、扩增能力强、灵敏度高、稳定性好等优良特点。独特的 PCR 缓冲体系与热启动酶的组合, 显著提高了 PCR 的扩增效率, 灵敏度更高, 抑制物耐受性更强。

该产品应用范围广, 不仅适用于普通和染料法实时荧光定量 PCR, 更适用于法医多重 STR 扩增反应, 可用于法医学分析、亲权鉴定以及科研等人类遗传鉴定方面。

注意事项

1. 使用前请在本品完全融化后上下颠倒轻轻混匀, 并经短暂离心后使用。
2. 避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降。本品可置于-20℃长期保存。

使用方法

以下举例为 STR 检测反应体系和反应条件, 实际操作中应根据具体用途、模板、引物结构、目的片段大小和扩增效果不同进行相应的改进和优化。

PCR 反应体系

提取 DNA 扩增反应体系:

试剂	10 μ L 体系	25 μ L 体系	终浓度
2.5 $\times$ TFS Master Mixture	4 μ L	10 μ L	1 $\times$
5 $\times$ Primer Mix ¹⁾	2 μ L	5 μ L	1 $\times$
Template DNA ²⁾	X μ L	X μ L	
ddH ₂ O	Up to 10 μ L	Up to 25 μ L	

血卡直扩反应体系:

试剂	10 μ L 体系	25 μ L 体系	终浓度
2.5 $\times$ TFS Master Mixture	4 μ L	10 μ L	1 $\times$
5 $\times$ Primer Mix	2 μ L	5 μ L	1 $\times$
血卡样本大小	1.0 mm	1.2 mm	
ddH ₂ O	Up to 10 μ L	Up to 25 μ L	

注意:

- 1) 引物设计时, 应尽量减小各引物的 T_m 间的差值, 差值尽量控制在 5 $^{\circ}$ C 以内。扩增效率不高的情况下, 可提高引物浓度; 发生非特异性扩增时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。为达到最优扩增效果, 建议引物混合物使用前涡旋震荡 10 s 短暂离心后使用。
- 2) 通常 DNA 模板的量以 0.1 ng-1 ng 人基因组 DNA 为参照, 可根据扩增效果调整模板投入量, 以确定最佳的模板使用量。
- 3) 操作过程中应避免人源基因组污染, 推荐实验时设置一组阴性对照 (无 DNA)。

2. PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 s-2 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	5 s	28-31 ⁴⁾
退火、延伸	55-65 $^{\circ}$ C ¹⁾	90-150 s ²⁾	28-31 ⁴⁾
终延伸	60 $^{\circ}$ C	10-40 min ³⁾	

注意:

- 1) 推荐采用两步法 PCR 反应程序。若因引物 T_m 值较低或引物间 T_m 值相差较大等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试使用三步法 PCR 扩增, 退火温度请以 55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C 的范围作为设定参考 (退火温度通常比 T_m 值低 5 $^{\circ}$ C), 延伸温度设置为 72 $^{\circ}$ C。
- 2) 当得不到良好的扩增效果时, 可适当延长退火、延伸时间至 120 s-150 s。
- 3) 当 PCR 产物检测出现加 A 不完全时, 可适当延长终延伸时间至 30-40 min。
- 4) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数, 如果循环次数太少, 扩增量不足, 推荐循环数为 28-31 个循环。
- 5) 血卡直扩可根据实际扩增效果增加 72 $^{\circ}$ C 裂解步骤以提高扩增效率。
- 6) 当使用 ABI 9700 热循环仪时, 请在 MAX 模式下进行扩增。
- 7) PCR 产物可置于 2-8 $^{\circ}$ C 短期保存, 也可置于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

试剂	50 μ l 体系	25 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2×HyperProbe Mixture	25 μ l	12.5 μ l	10 μ l	1×
Forward Primer, 10 μ M	1 μ l	0.5 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M1)
Reverse Primer, 10 μ M	1 μ l	0.5 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M1)
Probe2)				
Template DNA3)	X μ l	X μ l	X μ l	
ddH ₂ O	up to 50 μ l	up to 25 μ l	up to 20 μ l	

注意：

- 1) 通常引物浓度以 0.2 M 可以得到较好结果，可以在 0.1-1.0 μ M 作为设定范围的参考。扩增效率 不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。
- 2) 所用探针的终浓度，与使用的荧光定量 PCR 仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用 时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。
- 3) 通常 DNA 模板的量以 10-100 ng 基因组 DNA 或 1-10 ng cDNA 为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。

PCR 反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	30s1)	
变性	95℃	10 s	40-45 个循环数
退火/延伸	58℃	20 s2)	40-45 个循环数

- 1) 本产品所采用的酶在预变性 95℃、30 s 条件下实现酶的活化。在此条件下，大多数模板可良 好的进行解链。对 GC 含量高、二级结构复杂的模板，可将预变性时间延长至 1 分钟，以使起始模 板充分解链，若高温处理时间过长，会对酶的活性造成影响；对于简单模板也可采用预变性 20 s，可根据模板情况确定最佳的预变性时间。
- 2) 建议采用两步法 PCR 反应程序，退火温度请以 58-64℃作为设定范围的参考，发生非特异性反 应时，可提高退火温度。若因使用 T_m 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进 行三步法 PCR 扩增，退火温度请以 56℃-64℃的范围作为设定参考。几种常见仪器的退火延伸时间设定见下表：使用 Roche、BioRad、Agilent 和 宏时、东胜龙等公司荧光定量 PCR 仪时请设定在 20 s。使用 ABI 7000/7300/7500 时请设定在 30 s。退火/延伸时间可根据使用不同型号仪器和不同模板进行设定，请按照仪器使用说明书要求进行实 验操作。