

动物组织（鼠尾、鼠耳）直接 PCR 试剂盒

货号: PC1400

规格: 100T/500T

保存: -20°C保存, 有效期 1 年。DNA Extraction Solution 和 Stop Solution 可以 4°C 保存, 3 个月内有效。

产品内容:

试剂盒组成	100T(20μl 的 PCR 反应体系)	500T(20μl 的 PCR 反应体系)
DNA Extraction Solution	9.6mL	48mL
Enzyme Mix	0.4mL	2mL
Stop Solution	10mL	50mL
PCR Master Mix (Green, 2×)	1mL	5mL
说明书	1 份	1 份

产品简介:

动物组织直接 PCR 试剂盒可以从鼠尾(mouse tail)、鼠耳(mouse ear)或其它动物组织如口腔取样棉签(buccal swabs)、头发(hair shafts)、唾液(saliva)等中快速提取和 PCR 扩增基因组 DNA, 用于基因型鉴定等。本试剂盒能快速消化组织样品获得基因组 DNA, 无需机械破碎、有机萃取、柱纯化和 DNA 沉淀, 基因组 DNA 抽提的过程仅需约 20 分钟。

本试剂盒适用于小鼠等的基因型鉴定(genotyping), 大规模生物样品的高通量 PCR 筛选(high-through PCR screening), 转基因筛选(transgene screening), 基因敲除分析(knockout analysis)和测序(sequencing)。本试剂盒中提供的 PCR Master Mix (Green, 2×)中含有 2×Taq DNA Polymerase, 2×PCR Buffer, 2×dNTP 和 2×上样缓冲液, 只需加入适量引物、模板和水即可进行 PCR 扩增, 大大简化了 PCR 操作, 减少了 PCR 操作过程中可能导致的污染。PCR 完成后可以直接上样电泳, 无需再添加上样缓冲液。使用本试剂盒进行 PCR 检测时仅需极少量的样品就能完成目的基因的扩增和分析。使用本试剂盒提取的小鼠尾巴基因组 DNA 直接 PCR 的效果可参照图 1。

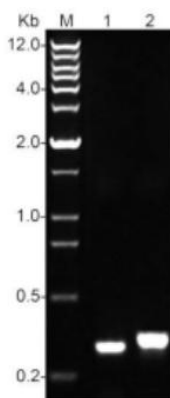


图 1. 本试剂盒提取的小鼠尾巴基因组 DNA 直接 PCR 后的电泳图。PCR 反应使用的引物是根据小鼠 GAPDH 和 HSP70 基因序列进行设计的,泳道 1(GAPDH)和 2(HSP70)的 PCR 产物大小分别为 299bp 和 403bp。M, marker。

使用说明:

1.小鼠尾巴、动物组织、头发或唾液基因组 DNA 的提取

1) 消化液的配制: 按照样本数量配制消化液, 具体配制方法如下:

试剂	1 个样品	10 个样品
DNA Extraction Solution	96µl	960µl
Enzyme Mix	4µl	40µl

注: 消化液需现配现用, 并需要在充分混匀后使用。

2) 不同组织样品基因组 DNA 的提取。

(a) 新鲜或冻存的小鼠尾巴: 实验前用 70%的乙醇冲洗剪刀和镊子。剪取 0.2-1cm 的小鼠尾尖置于上述配制好的 100µl 消化液中, 需确保小鼠尾巴完全浸没在溶液中(一般情况下, 重量约为 15mg 的 1cm 长的小鼠尾尖刚好能浸没在含有 100µl 消化液的 PCR 管中, 小鼠尾巴的重量不宜超过 15mg)。对于新鲜的小鼠尾巴, 建议尽量在剪下鼠尾后 30 分钟内进行基因组 DNA 抽提, 否则宜尽快冷冻存放。

(b) 头发: 实验前用 70%的乙醇冲洗剪刀和镊子。剪除头发的多余部分, 仅需保留头发的根部区域并将其置于上述配制好的 100µl 消化液中, 每次提取只需一根带根部的头发。

(c) 唾液: 吸取 10µl 的唾液加入上述配制好的 100µl 消化液中, 涡旋或移液枪吹打混匀。

3) 将样品置于 55°C 水浴或 PCR 仪, 孵育 15 分钟。

4) 将样品置于 95°C 水浴或 PCR 仪, 孵育 5 分钟(孵育结束后组织未完全消化属于正常现象, 不会影响试剂盒的检测效果)。

5) 向上述样品中加入 100µl 的 Stop Solution, 涡旋混匀。

6) 将上述提取样品置于 -20°C 或 4°C 保存或立即进行 PCR 检测(若需长期保存样品, 应将未消化的组织去除或将提取物转移到新的离心管中。大部分情况下, 提取物 4°C 能保存至少 1 个月, -20°C 至少能保存一年)。

2. PCR 扩增

1) PCR 反应体系的设置:

(a) 融解并混匀 PCR 反应所需的各种溶液。将 PCR Master Mix (Green, 2×)置于冰浴上或冰盒内。

(b) 参考下表在冰浴上配制 PCR 反应体系:

试剂	最终浓度	体积
双蒸水或 Milli-Q 水	-	7.4µl
模板(消化产物)	2-20ng/µl	1µl
引物混合物(10µM each)	0.8µM	1.6µl
PCR Master Mix (Green, 2×)	1×	10µl
总体积	-	20µl

(c) 用移液器轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

(d) 如果所使用的 PCR 仪有热盖则省略本步骤。如果 PCR 仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油。

(e) 把配制好的 PCR 反应体系置于 PCR 仪上，开始 PCR 反应。

2) PCR 反应参数的设置可以参考如下示例：

预变性	94℃	3min	} 30-35 cycles
变性	94℃	30sec	
退火	55℃	30sec	
延伸	72℃	1kb/min	
最终延伸	72℃	10min	
临时保存	4℃	-	

3. 琼脂糖凝胶电泳

PCR 反应结束后直接上样进行琼脂糖凝胶电泳。

FAQ:

1. PCR 产物少或没有目的条带

- 组织提取物中的污染物抑制了 PCR 反应。为检测抑制物，可用等体积混合的 DNA Extraction Solution 和 Stop Solution，同时用 DNA 对照或已知数量的模板(100-500 copies)进行 PCR 反应。
- 组织消化不够充分。可适当延长 55℃ 消化时间或适当增加 Enzyme Mix 的使用量。
- Enzyme Mix 未被完全灭活。适当延长消化产物在 95℃ 的孵育时间。
- 引物设计不佳是 PCR 过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点等后整条引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。
- 待扩增片段 GC 含量偏高。GC 含量较高的情况下 PCR 会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高 GC 含量 DNA 片段的 GC-rich buffer，并相应地根据 GC-rich buffer 的要求或说明调整 PCR 反应参数的设置。
- 长片段扩增。尽管 Taq DNA polymerase 可以扩增最长达 8kb 的 DNA 片段，但大多数时候比较适合扩增 2-3kb 以下的片段，更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的 DNA 聚合酶。
- PCR 反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置 PCR 反应。
- 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用 Touch down 等方法进行退火，通常采用从 65℃ 逐步缓慢降温到 55℃ 或 50℃ 的方法，使退火更加充分。
- 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度 PCR 仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度 PCR 仪，则可以通过多次 PCR 反应摸索最佳的退火温度。
- 延伸时间不足。可按照每 1kb 片段延伸 1 分钟进行设置，对于较难扩增的片段可以设置为每 1kb 片段延伸 1.5-2 分钟。
- 待扩增片段 GC 含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至 95℃ 1min 甚至 95℃ 2-4min。
- 在不同 PCR 仪上进行 PCR 反应，避免有时 PCR 仪出现问题。

- m. 循环数不足,适当延长 PCR 的循环数。通常循环数最高不必超过 40,常用的循环数范围为 25-35。
- n. 模板含量太低,适当加大模板量,或采用巢式 PCR(nested PCR)或二次 PCR。巢式 PCR 即为在原先设计的 PCR 引物内侧再设计一对 PCR 引物,然后对第一次 PCR 产物进行稀释后再进行一次 PCR 扩增,这样一方面可以起到扩增作用,同时也可以从第一次 PCR 产物中扩增出特异性条带。二次 PCR 则为比较简单地用原有引物对第一次 PCR 产物进行稀释后再进行一次 PCR 扩增,可以起到扩增作用,但不能去除非特异性条带。
- o. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。

2. 组织在孵育后未完全消化

- a. 有些组织很难完全消化。索莱宝生产的直接 PCR 试剂盒不要求组织完全消化,部分消化提取的 DNA 通常也足够满足 PCR 检测。