

动物组织直接PCR试剂盒

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------|------|
| D7281S | 动物组织直接PCR试剂盒 | 100次 |
| D7281M | 动物组织直接PCR试剂盒 | 500次 |

产品简介:

- 碧云天生产的动物组织直接PCR试剂盒(Animal Tissue Direct PCR Kit)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以用于基因型鉴定等。
- 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Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)中含有2X Taq DNA Polymerase, 2X PCR Buffer, 2X dNTP和2X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。

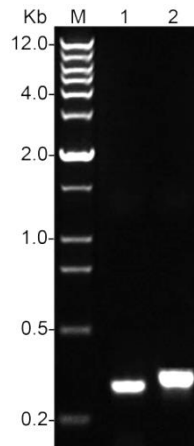


图1. 本试剂盒提取的小鼠尾巴基因组DNA直接PCR后的电泳图。PCR反应使用的引物是根据小鼠GAPDH和HSP70基因序列进行设计的, 泳道1(GAPDH)和2(HSP70)的PCR产物大小分别为299bp和403bp。M, marker。

- 对于20微升的PCR反应体系, 本试剂盒的两种包装分别可用于100个或500个样品的直接PCR反应。

包装清单:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|---------------------------------------|-------|
| D7281S-1 | DNA Extraction Solution | 9.6ml |
| D7281S-2 | Enzyme Mix | 0.4ml |
| D7281S-3 | Stop Solution | 10ml |
| D7281S-4 | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 1ml |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|---------------------------------------|------|
| D7281M-1 | DNA Extraction Solution | 48ml |
| D7281M-2 | Enzyme Mix | 2ml |
| D7281M-3 | Stop Solution | 50ml |
| D7281M-4 | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 5ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20°C保存，一年有效。DNA Extraction Solution和Stop Solution可以4°C保存，3个月内有效。

注意事项：

- 使用本试剂盒消化小鼠尾巴或其它组织样品时，一定要确保组织样品充分浸没在消化液中。
- 配制消化液时，DNA Extraction Solution和Enzyme Mix混匀后，应尽快使用，放置太久可能会影响DNA抽提效果。
- 由于PCR反应非常灵敏，可以扩增目的基因片段超过1000万倍，在使用Taq酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- 本试剂盒中的Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)经过15次反复冻融后仍具有和冻融前几乎相同的PCR扩增效果，但仍宜适当避免过多的反复冻融，并且在使用前，一定要完全融化，并上下颠倒轻轻混匀后才能使用，并尽量避免起泡。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

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

a. 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。

b. 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。

c. 将样品置于55°C水浴或PCR仪，孵育15分钟。

d. 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)。

e. 向上述样品中加入100µl的Stop Solution，涡旋混匀。

f. 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

a. 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Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)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 |
| Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 1X | 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(mineral oil, ST275)。

(e) 把配制好的PCR反应体系置于PCR仪上，开始PCR反应。

b. PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

| Step | Temperature | Time | Cycles |
|------|-------------|---------|--------|
| 起始变性 | 94°C | 3min | 1 |
| 变性 | 94°C | 30sec | 30-35 |
| 退火 | 55°C | 30sec | |
| 延伸 | 72°C | 1kb/min | |
| 最终延伸 | 72°C | 10min | 1 |

| | | | |
|------|-----|---------|---|
| 临时保存 | 4°C | forever | - |
|------|-----|---------|---|

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。

常见问题：

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°C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°C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°C逐步缓慢降温到55°C或50°C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°C 1min甚至95°C 2-4min。
- 在不同PCR仪上进行PCR反应，避免有时PCR仪出现问题。
- 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。
- 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。
- 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。

- 有些组织很难完全消化。碧云天生产的直接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。

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|---------------------------------|-------|
| D0061 | 哺乳动物基因组DNA抽提试剂盒 | 50次 |
| D0063 | 基因组DNA小量抽提试剂盒(离心柱式) | 50次 |
| D0065S | 动物基因组DNA快速抽提试剂盒(PCR分析用) | 100次 |
| D0065M | 动物基因组DNA快速抽提试剂盒(PCR分析用) | 500次 |
| D7281S | 动物组织直接PCR试剂盒 | 100次 |
| D7281M | 动物组织直接PCR试剂盒 | 500次 |
| D7283S | 鼠尾基因型快速鉴定试剂盒 | 100次 |
| D7283M | 鼠尾基因型快速鉴定试剂盒 | 500次 |
| D7205 | Taq DNA Polymerase | 200U |
| D7207 | Taq DNA Polymerase | 1000U |
| D7209 | Taq DNA Polymerase | 5000U |
| D7216 | Pfu DNA Polymerase | 200U |
| D7217 | Pfu DNA Polymerase | 1000U |
| D7218 | BeyoTaq DNA Polymerase | 200U |
| D7219 | BeyoTaq DNA Polymerase | 1000U |
| D7220 | BeyoFusion™ DNA Polymerase | 200U |
| D7221 | BeyoFusion™ DNA Polymerase | 1000U |
| D7222 | BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase | 200U |

| | | |
|-------------|--|---------|
| D7222B | BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase | 1000U |
| D7228 | 2X PCR Master Mix | 400次 |
| D7232 | PCR Kit with Taq | 400次 |
| D7233 | PCR Kit with Taq | 2000次 |
| D7237 | PCR Kit with BeyoTaq | 400次 |
| D7251-1ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X) | 100次 |
| D7251-4ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X) | 400次 |
| D7251-20ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X) | 2000次 |
| D7251-100ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X) | 10000次 |
| D7255-1ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 100次 |
| D7255-4ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 400次 |
| D7255-20ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 2000次 |
| D7255-100ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) | 10000次 |
| D7259-1ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X) | 100次 |
| D7259-4ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X) | 400次 |
| D7259-20ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X) | 2000次 |
| D7259-100ml | Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X) | 10000次 |
| D7366 | dNTP (4管套装, 100mM) | 4×50μl |
| D7371 | dNTP Mixture (2.5mM each) | 1ml |
| D7373 | dNTP Mixture (25mM each) | 250μl |
| ST275 | Mineral oil/矿物油 | 20ml |
| FTUB002 | 200微升薄壁PCR管(凸盖) | 1000个/包 |
| FTUB003 | 200微升薄壁PCR管(平盖) | 1000个/包 |
| FTUB108 | 200微升八联管(PCR排管) | 200套/包 |
| FTUB110 | 96管PCR板 | 10个/包 |
| FTUB111 | 96管PCR板(带边框) | 10个/包 |
| FTUB113 | 八联管盖(用于八联管或96管PCR板) | 200条/包 |
| FTUB116 | 十二联管盖(用于96管PCR板) | 200条/包 |
| FSF007 | 封板膜(透明, Axygen分装) | 100片/包装 |
| FSF008 | 封板膜(透明, Axygen原装) | 500片/包装 |
| FSF021 | 封板膜(白色) | 100片/包装 |
| FSF025 | 封板膜(黑色) | 100片/包装 |
| R0123 | RNase and DNase Away | 250ml |
| R0125 | RNase, DNase and DNA Away | 250ml |
| R0127 | RNase, DNase, RNA and DNA Away | 250ml |

Version 2019.01.11