

For research use only

Version Number: 1.1

Mouse Tail Direct PCR Kit

For performing PCR directly from mouse tissue (tail or ear) without prior DNA purification

| 试剂盒组成 (100 μ L 裂解体系 + 20 μ L PCR 体系) | | TP-01331 | TP-01333 |
|---|-------------------------------|-----------------|--------------------|
| | | 200 T | 2000 T |
| Part I | Buffer MP | 20 mL | 100 mL \times 2 |
| | Foregene Protease Plus | 800 μ L | 8 mL |
| | 6 \times DNA Loading Buffer | 1.5 mL | 6 mL |
| Part II | 2 \times M1-PCR Easy™ Mix | 1 mL \times 2 | 1.7 mL \times 12 |
| 说明书 | | 1 份 | 1 份 |

产品简介

本产品采用独特的裂解缓冲液体系可以快速的从小鼠鼠尾、鼠耳、肌肉等组织样本中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65°C 条件下 10-30 min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 等的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

2 \times M1-PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Foregene D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2 Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

运输及储存条件

- ❖ 运输条件：全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于 <4°C 状态。
- ❖ 保存条件：本试剂盒 Part I 保存在 2-8°C；Part II 保存在 -20°C。

产品特点

- ❖ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ❖ 样品需求量小，少到 2-5 mm 鼠或尾 5 mg 小鼠组织即可进行实验。
- ❖ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ❖ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ❖ 请尽量使用新近采取的小鼠组织样本进行实验，若组织样本存储较长时间，避免样本反复冻融。
- ❖ 若 Buffer MP 有沉淀析出，可放置于 37°C 待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ❖ Foregene Protease Plus 具有独特配方，请置于 4°C 存储，切勿置于 -20°C。
- ❖ 2 \times M1-PCR Easy™ Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ❖ 如果环境温度过高，2 \times M1-PCR Easy™ Mix 可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2 min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。
- ❖ 电泳检测时，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中出现一大团拖尾亮带，影响实验结果判断。

操作指南

A: 样本 DNA 释放

1. 在离心管中加入 **100 μ L Buffer MP**, **4 μ L Foregene Protease Plus**, 轻微涡旋混匀。

注意: Buffer MP 与 Foregene Protease Plus 混合后不宜长期保存, 配制后请尽快使用。

2. 剪取 **2-5 mm 鼠尾**或 **5-10 mg 组织**放入上述离心管中, 轻微涡旋混匀。

注意: 尽量剪碎小鼠组织, 以便酶解反应更顺利的进行。

3. **65°C 孵育 10-30 min**, 然后 **95°C 处理 5 min**。

注意: 65°C 孵育, 一般只需 10 min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难酶解, 可以将时间延长至 30 min。组织块不需完全酶解, 残余的部分在后续离心步骤中可被除去。

4. 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 5 min。

5. 转移上清至新的离心管, 4°C 或 -20°C 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

B: PCR 反应鉴定

1. 在 PCR 管内加入相应的 2 \times M1-PCR Easy™ Mix 以及特异引物待用。

2. 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到上述配制的 PCR 体系中(体系配制见表 1)。

注意: 用于后续 PCR 检测时, 模板量占 PCR 体系的 **1-10%** 之间最佳, 不能超过 20%。如 50 μ L 的 PCR 体系中, 加入 0.5-5 μ L 裂解液即可, 但不能超过 10 μ L。

3. 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(反应条件见表 2)。

注意: 尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应, 可以得到更好的结果。

4. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

注意: 建议使用随试剂盒配送的 6 \times DNA Loading Buffer, 切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 1: PCR 反应体系配制

| PCR 体系添加内容 | 用 量 | | 终 浓 度 |
|----------------------------|---------------|----------------|--------------------------------|
| 2 \times M1- Easy™ Mix | 10 μ L | 25 μ L | 1 \times |
| Forward Primer(10 μ M) | 0.5 μ L | 1 μ L | 0.2-0.25 μ M ^{1*} |
| Reverse Primer(10 μ M) | 0.5 μ L | 1 μ L | 0.2-0.25 μ M ^{1*} |
| 裂解混合液(DNA模板) ^{2*} | X μ L | X μ L | |
| ddH ₂ O(灭菌蒸馏水) | (9-X) μ L | (23-X) μ L | |
| Total Volume | 20 μ L | 50 μ L | |

1*: 通常引物终浓度为 0.2-0.25 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

2*: 裂解产物作为 PCR 模板, 加入量在 PCR 体系 1-10% 之间最佳, 实际操作可进行模板加入量条件摸索, 找到最佳模板用量。

注意: 此体系配制仅作参考, 实验室可根据需要调整 PCR 体系大小, 添加适当比例的裂解混合液即可。配制好 PCR 反应体系, 置于涡旋仪上涡旋混匀, 瞬时离心将反应液集于管底。

表 2: 反应条件举例

| 步 骤 | 温 度 | 时 间 | 循 环 数 | 内 容 |
|-----|---------|-------------------------------|-------|------|
| 1 | 94°C | 3 min | 1 | 预变性 |
| 2 | 94°C | 10 sec | 30-40 | 变性 |
| 3 | 55-65°C | 20 sec | | 引物退火 |
| 4 | 72°C | X min (2kb/min) ^{2*} | | 延伸 |
| 5 | 72°C | 5 min | 1 | 终延伸 |

1*: 2 \times M1-PCR Easy™ Mix 对高 GC 含量的模板具有很好的扩增能力, 在进行 PCR 时, 我们建议所有引物的退火温度比 T_m 值高 2°C。

2*: 1 kb 以内的 DNA 片段, 建议延伸时间为 30 sec。

注意: 此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件, 包括退火温度, 延伸时间等。