



Blood SuperDirect™ PCR Kit(UNG)-Heparin

Cat.No.TP-04221/04223

For direct PCR using whole blood anticoagulated with Heparin

For performing PCR directly without prior DNA purification

For research use only



目 录

产品介绍	3
产品特点	4
试剂盒应用	4
试剂盒局限性	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
注意事项	6
操作前准备事项	7
实验材料和设备	7
安全性	7
操作指南	8
● 操作步骤	8
对照反应	10
操作示意图	11
问题分析指南	12

产品介绍

本产品采用独特的 PCR 缓冲液体系，无需 DNA 提取或样品处理即可以全血样本为模板进行直接 PCR。EDTA、Heparin 抗凝全血以及含有血液的采集卡(如 Whatman 903® 和 FTA®采血卡)均可直接用于 PCR 扩增鉴定，极大的缩短了检测时间。

本试剂盒提供的 2× SuperEasy™ Mix 具有很强抑制物耐受性，人血作为 PCR 模板最大加入量可达 PCR 体系的 45%，鼠血的可达 20%，可以灵敏的扩增血液样本中基因组和外源目的 DNA 片段。

2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 包含本公司特有的 Foregene D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、Taq Reaction Buffer、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂。

2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 在 2× SuperEasy™ Mix-Heparin 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶(Uracil-N-glycosylase)。在 PCR 反应前，利用 UNG 酶降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，UNG 酶对不含有尿嘧啶的模板不会造成任何影响，从而保证扩增的特异性和准确性，防止了大规模基因检测时可能出现的 PCR 产物污染问题。

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 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

根据所用抗凝剂的不同，该产品分为两个大类：EDTA 抗凝全血直接 PCR 试剂盒系列(Blood SuperDirect™ PCR Kit-EDTA)和 Heparin 抗凝全血直接 PCR 试剂盒系列(Blood SuperDirect™ PCR Kit-Heparin)；也可以根据实验需要选择相应的试剂盒，详见试剂盒类型的选择。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化，无需预处理，直接使用全血作为 PCR 模板。
- ◆ 体系扩增能力强，可以灵敏的检测出血液中基因组和外源目的 DNA 片段。
- ◆ 2× SuperEasy™ Mix(UNG)- Heparin 血液耐受度高：人血可达 45%，鼠血可达 20%。
- ◆ 样本全封闭式操作，无需担心样本污染和 PCR 结果假阳性。
- ◆ 防污染 PCR 体系 2× SuperEasy™ Mix(UNG)- Heparin，有效消除由 PCR 产物所引起的污染，保证扩增的特异性和准确性。

试剂盒应用

专用于 Heparin 抗凝全血直接 PCR 鉴定。(包括：人血、鼠血、鸡血、鸟血、牛血、狗血等)。

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段 ≤ 1 kb；超过 1 kb，扩增效率下降或者扩增失败。
- ◆ UNG 防 PCR 产物污染体系得到的 PCR 产物请勿用于基因克隆或测序。
- ◆ PCR 产物 3'末端随机加 A 尾。

产品质量控制

按照凡晶试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的血液直接 PCR 系列试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Blood SuperDirect™ PCR Kit(UNG)- Heparin Heparin 抗凝全血直接 PCR 试剂盒-UNG		
试剂盒组成 (20 μL PCR 体系)	TP-04221	TP-04223
	200 T	2000 T
2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin	1 mL × 2	1.7 mL × 12
6× DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
说明书	1 份	1 份

储存条件

1. 运输条件

2. 全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于 < 4°C 状态。

3. 保存条件

本试剂盒保存在-20°C。

- ❖ 2× SuperEasy™ Mix(UNG)- Heparin，若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。
- ❖ 6× DNA Loading Buffer，可置于 4°C 或-20°C 长期保存。

试剂盒组分信息

- ◆ 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin: 在 2x SuperEasy™ Mix-Heparin 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP, 并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶, 从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。包含 Foregene 特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时, 只需将适当的抗凝全血、引物、ddH₂O 添加到相应的 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ 6x DNA Loading Buffer: 该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在进行琼脂糖凝胶电泳时, 配搭使用试剂盒附赠的 6x DNA Loading Buffer, 以便取得好的电泳结果。切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer, 否则在电泳时会在泳道中有一大团拖尾亮光, 影响实验结果判断。

注意事项: (请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 请尽量使用新近采取的抗凝血样本进行相关实验; 若是冻存的样本, 避免反复冻融, 否则会导致作为 PCR 模板的 DNA 片段较小, 影响 PCR 效率。
- ◆ 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。
- ◆ 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 应避免反复冻融, 否则会影响 PCR 效率
- ◆ 如果环境温度较高, 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 可能会变浑浊, 可置于冰上放置 1-2min, 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。

操作前准备事项

使用本试剂盒前, 请务必仔细阅读说明书。血液直接 PCR 系列试剂盒操作简单、方便、快速, 说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 新鲜或保存好的 Heparin 抗凝全血或纯化的 DNA。
- ◆ 0.2 mL 无菌 PCR 管。
- ◆ PCR 仪、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用, 请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时, 穿戴合适的实验服, 手套, 防护眼镜等。

操作指南

本说明书根据实验材料差异及实验目的的不同，客户可根据自己的实验需要，选择相应的试剂盒。

材料取用说明

- ❖ 尽量取用新近采取的血液样本进行实验，冻存样本避免反复冻融。
- ❖ 若是进行基因组上的目的片段检测，我们建议尽量使用少量的血液量作为模板；若是检测血液样本中某种病毒或细菌等的目的片段，我们建议扩大 PCR 体系并使用较大的血液模板。血液模板最多占 PCR 体系的 45%(人血)、20%(鼠血)。

血液直接 PCR 操作步骤

该试剂盒操作简便，只需取适量抗凝血液加入 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 中，添加相应引物、ddH₂O 补齐体系即可进行 PCR 扩增。具体的操作见下详细操作步骤：

1. 在 200 μL PCR 管内加入相应的 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin、引物、适量的 ddH₂O 待用。
2. 取适量抗凝血液加入上述配制的 PCR 体系中，使得 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin 稀释至 1×(体系配制见表 1)。
注意：由于样本不同或样本保存时间的差异，我们建议在大规模 PCR 鉴定前进行模板浓度梯度条件摸索，找到最适样本加入量。
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. PCR 结束后，将 PCR 产物移至离心机中，10,000 ×g 离心 2 min，收集上清液进行电泳检测。
注意：由于血液本身的原因，PCR 结束后在 PCR 管的底部会出现透明凝胶状物质，此为正常现象。
5. 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× 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
2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin	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*}
抗凝全血 ^{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 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*: 若模板使用含有血液的采集卡, 可截取直径1-4 mm的血点, 直接加入20-50 μ L PCR反应体系进行扩增。

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

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	55-65°C ^{1*}	20sec		引物退火
5	72°C	X min (2kb/min) ^{2*}		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1*: 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin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各异。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。

PCR 对照反应

在PCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，建议在进行PCR时，设置阳性和阴性PCR对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

A: 阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin系列PCR Mix有效性。其反应体系的配制见表3。

表 3: 阳性对照反应体系配制

PCR 体系添加内容	用量		终浓度
2× SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin	10 μL	25 uL	1×
Forward Primer (10 μM) ^{1*}	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM
Reverse Primer (10 μM) ^{1*}	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM
Template(DNA) ^{2*}	X μL	X μL	100-200 ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X) μL	(23-X) μL	
Total Volume	20 μL	50 μL	

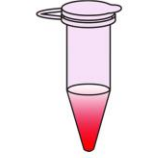
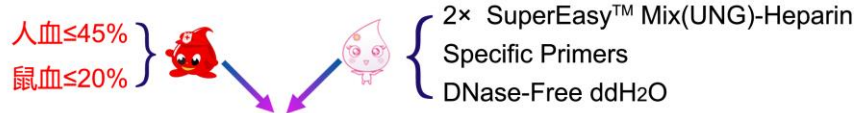
1*: 引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、基因组上的保守序列等(确保这些引物的可用性)。

2*: 可选用样本纯化的 DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B: 阴性对照

PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染或实验是否有其他污染源。

操作示意图



PCR 反应体系	
组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2x SuperEasy™ Mix(UNG)-Heparin	10μl
Specific Primers	1μl
Blood(Templater)	xμl
DNase-Free ddH ₂ O	(9-x)μl

PCR 反应条件			
Step	Temp	Time	Cycles
1	37°C	5min	1
2	94°C	5min	1
3	94°C	10sec	} 35-40
4	55-65°C	20sec	
5	72°C	Xmin(2kb/min)	
6	72°C	5min	1

琼脂糖凝胶电泳检测结果

问题分析指南

以下针对血液直接 PCR 系列试剂盒在血液直接 PCR 实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的使用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就分别对使用血液直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

正对照、待测样本均无条带

1. PCR 反应体系或反应条件不合适。

建议：使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2x SuperEasy™ Mix 系列 PCR Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃短时间存放。

3. 引物设计问题。

建议：尝试重新设计引物进行检查。

正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱

1. 血液样本保存不当，基因组 DNA 降解。

建议：抗凝全血可在 4℃保存 2-8 天，需长时间保存可将样本置于在-20℃或-70℃冻存，并避免反复冻融。

2. PCR 条件没有使用正确。

建议：请仔细确认 2x SuperEasy™ Mix 的类型，对应相应的 PCR 条件进行 PCR 扩增。

3. 模板加入量不适合。

建议：可在 PCR 体系 10%-30%范围内优化血液加入量；若是扩增血液样本中的病毒或细菌 DNA 片段，可将模板量增加至 30%-40%。

4. PCR 循环数不足。

建议：适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。

非特异性扩增

1. 退火温度偏低。

建议：适当提高退火温度。或对退火温度做一个梯度摸索。

2. PCR 循环数过多。

建议：适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。

3. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度。

4. 模板加入量过多。

建议：将模板加入量控制在 10-20%。反应效性能较差时，可以降低模板浓度调节到低于 10%的范围。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。

2. PCR 产物污染。

建议：如果实验室检测同类型样本多，最好使用 UNG 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

中国·凡晶 World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

