

For research use only

Version Number:

1.1

2. 保存条件: 本试剂盒 Part I 保存在 2-8°C; Part II 保存在 -20±5°C.

QuickEasy™ Mouse Tail Direct PCR Kit (With Dye)-UNG

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

试剂盒组成 (100 µL 裂解体系 + 20 µL PCR 体系)		DP-01011	DP-01012
		200T	2000T
Part I	Buffer MP	20 mL	100 mL × 2
	Foregene Protease Plus	200 µL	1 mL × 2
Part II	2× Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye)	1 mL × 2	1 mL × 20
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地从小鼠鼠尾、鼠耳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（1kb 以内片段）。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65°C 条件下 2 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。PCR Mix 添加专门用于 Direct PCR 的热启动 Taq 酶（Direct HS-Taq），可大幅度提高 PCR 扩增特异性。PCR Mix 中添加了电泳指示剂，反应完成后可直接上样电泳，无需制样。

运输及储存条件

1. 运输条件: 全程低温冰盒运输。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量少，1-2 mm 鼠尾（或等量鼠耳）即可进行实验。
- ◆ 操作简便，7 min 完成样本制备，无需研磨、破碎等特殊处理。
- ◆ Direct HS-Taq 引入直接 PCR 体系，提高 PCR 特异性。
- ◆ 优化的 PCR 体系，具有更高的特异性、耐受性。
- ◆ 防污染 2× Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye)，有效消除由 PCR 产物所引起的污染。
- ◆ PCR Mix 中添加了电泳指示剂，反应完成后可直接上样电泳，无需制样。

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，请避免样本反复冻融。
- ◆ 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× Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye) 避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高，2× Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye) 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。
- ◆ 扩增片段 ≤ 1 kb；超过 1 kb，扩增效率下降或者扩增失败。

预防样本间交叉污染

为避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2% 次氯

酸钠溶液中,反复洗刷数次进行清洗,然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便,也可准备多个取样器材,在使用完后进行统一清洗,确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材。

操作指南

A: 样本 DNA 释放

- 剪取 1-2 mm 鼠尾 (或等量鼠耳) 放入干净的离心管中。
- 在上述离心管中加入 100 μ L Buffer MP, 1 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。
- 65°C 孵育 2 min, 然后 95°C 处理 5 min。
注意: 若需要的 DNA 浓度较高, 可以将 65°C 孵育时间延长至 10 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。
- 瞬时离心后, 转移上清至新的离心管, 4°C (可保存 30 天) 或 -20°C (可保存 6 个月) 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

B: PCR 反应鉴定

- 在 PCR 管内加入相应的 2 \times Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye) 以及特异引物待用。
- 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(体系配制见下表 1)。
注意: 用于后续 PCR 检测时, 模板量占 PCR 体系的 2~5% 之间最佳, 不能超过 10%。如 20 μ L 的 PCR 体系中, 加入 0.4~1 μ L 裂解产物即可, 但不能超过 2 μ L。
- 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(推荐反应条件见下表 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。
- 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 1: PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 \times Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye)	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 2-5% 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	37°C	5 min	1	UNG 酶处理
2	95°C	3 min	1	预变性
3	95°C	10 sec	30-40	变性
4	55-65°C ^{1*}	20 sec		引物退火
5	72°C	x min (2kb/min) ^{2*}		延伸
6	72°C	5 min	1	终延伸

1*: 2 \times Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG(dye) 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。