

Mouse Tissue Direct PCR Kit

目录号

BN12070

产品组成

组分	规格
2×Mouse Tissue Direct PCR Mix	5×1.0 mL
Lysis Buffer	20 mL
Proteinase K	800 μL

保存条件

Lysis Buffer 2~8°C、其余组分-20°C保存 24 个月。

产品简介

本产品是一款专为小鼠基因型快速鉴定设计的试剂盒，包含 DNA 粗提取及 PCR 扩增体系。本产品可直接利用小鼠尾巴、耳朵、脚趾等组织经 Lysis Buffer、Proteinase k 简单裂解处理后进行 PCR 扩增，无需过夜消化、酚氯仿抽提或柱式纯化等操作，使用简便，极大缩短实验耗时。产品适用于 2 kb 以内目的片段的扩增以及 3 对引物以内的多重 PCR 反应。

本产品所提供的 2×Mouse Tissue Direct PCR Mix 中，包含经过基因工程改造的 DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs 及优化的缓冲体系，具有极高的扩增效率和抑制物耐受度，使用时只需加入模板和引物，并补水至 1×即可进行 PCR 反应，使用本产品扩增的 PCR 产物 3' 端带有一个突出的"A"碱基，纯化后可直接用于 TA 克隆。

产品特点

- ◇ 操作简便：无需提取基因组 DNA；
- ◇ 适用广泛：适用于多种小鼠组织的直接扩增。

适用范围

本产品适用于小鼠基因敲除分析、转基因检测、基因分型等。

注意事项

1. 为了避免样品间出现交叉污染, 需准备多个取样工具, 如需反复使用可在每次取样后用 2%次氯酸钠溶液或核酸清洁剂 (目录号: BN24231)对工具表面进行清洁;
2. 建议使用新鲜采取的小鼠组织, 取样量不宜过大, 以避免影响扩增结果;
3. Lysis Buffer 的保存条件为 2~8°C, 若低温保存可能会出现沉淀, 在使用前务必充分溶解;
4. PCR Mix 应避免反复冻融, 短期内多次使用可置于 4°C保存。

使用方法

操作示例

1. 基因组 DNA 的释放

1) 裂解液配制

根据需要裂解的小鼠样品数量配制组织裂解液 (组织裂解液应现用现配, 且充分混匀后使用), 单个样品所需试剂比例如下:

组分	体积
Proteinase K	4 μ L
Lysis Buffer	200 μ L

2) 样品准备与裂解

推荐组织使用量:

组织类型	小鼠尾尖	小鼠耳朵	小鼠脚趾
推荐用量	1~3 mm	2~5 mm ²	1~2 个

取适量小鼠组织样品于干净的离心管中, 向每个离心管中加入 200 μ L 新鲜的组织裂解液, 涡旋震荡后在 55°C下孵育 30 min, 然后 98°C加热处理 3 min。

3) 离心

将裂解产物充分震荡混匀, 12,000 rpm 离心 5 min, 上清液可作为模板直接用于 PCR 扩增。模板如需保存, 可将上清液转移至另一个无菌离心管中, 并置于 -20°C保存, 保存时间为 2 周。

2. PCR 扩增

将 2 \times Mouse Tissue Direct PCR Mix 从 -20°C取出后置于冰上解冻, 上下颠倒混匀后按下表配制 PCR 反应体系 (冰上操作):

组分	25 μ L 体系	50 μ L 体系	终浓度
2 \times Mouse Tissue Direct PCR Mix	12.5 μ L	25 μ L	1 \times
Primer 1 (10 μ M)	1.0 μ L	2.0 μ L	0.4 μ M
Primer 2 (10 μ M)	1.0 μ L	2.0 μ L	0.4 μ M
裂解产物*	As require	As require	
ddH ₂ O	Up to 25 μ L	Up to 50 μ L	

*加入量不应超过体系的 1/10，加入量过高时，可能会抑制 PCR 扩增。

建议的 PCR 条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s	35~40 cycles
退火*	Tm+3~5 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s/kb	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
-	4 $^{\circ}$ C	Hold	-

*退火温度：参考引物 Tm 值，建议退火温度设置为引物中 Tm 较小值+3~5 $^{\circ}$ C；

常见问题与解决办法

Q1: 无目的条带?

A1:

- 1) 裂解产物过量。选择最合适的模板用量，一般不超过体系的 1/10；
- 2) 取样量过大。将裂解产物稀释 10 倍后扩增，或减少取样量重新裂解；
- 3) 组织样品不新鲜。建议使用新鲜的组织样品；
- 4) 引物质量差。使用基因组 DNA 进行扩增验证引物质量，优化引物设计。

Q2: 出现非特异扩增?

A2:

- 1) 退火温度过低、循环数过高。提高退火温度，减少循环数；
- 2) 模板浓度太高。减少模板用量或将模板稀释 10 倍后扩增；
- 3) 引物特异性差。优化引物设计。