鼠尾直接PCR试剂盒（快速基因型鉴定）

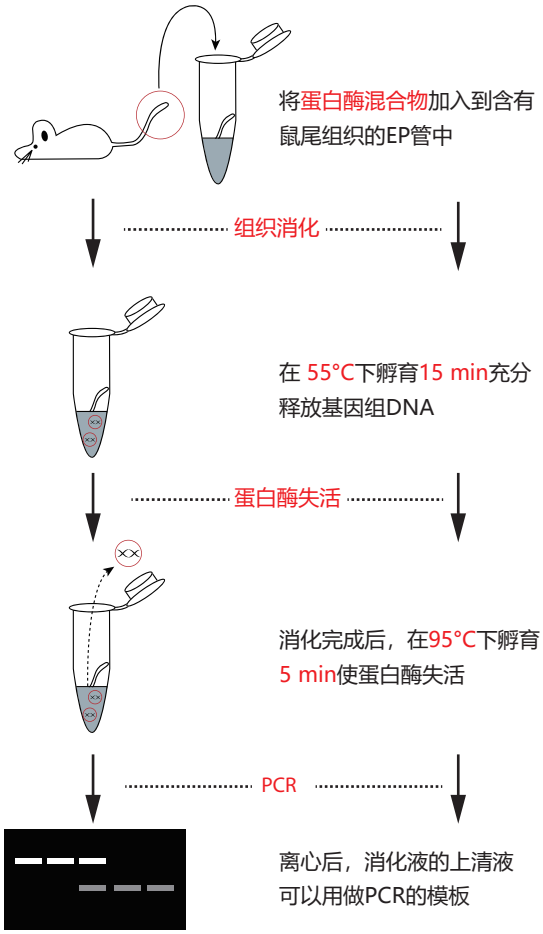
产品描述

本试剂盒专为小鼠快速基因型鉴定而研制，能够迅速从小鼠**尾巴**、**耳朵**或**脚趾**等组织中释放足量的基因组DNA，消化时间仅需**15分钟**，无需抽提与纯化，可直接将消化产物作为模板进行PCR扩增。

储存方法

Buffer L 4℃保存，其余组分-20℃保存。保质期2年。

实验方法



产品组分

产品组分	B40013 (200 rxns)	B40015 (500 rxns)	B45012 (500 rxns)
Buffer L	20 mL	50 mL	-
Protease Plus	0.4 mL	1 mL	-
2 x M-PCR OPTI™ Mix[a]	2 mL	5 mL	5 mL

a. 含有功能增强型DNA聚合酶、dNTPs、Mg^{2+}以及DNA Loading Dye。

1. 组织消化

按小鼠数量配制组织消化液，试剂比例如下：

	单样本
Protease Plus	2 μL
Buffer L	100 μL

组织消化液现用现配，充分混匀后使用。

1.2. 向每个含有小鼠组织样本[b]的EP管中加入100 μL[c]新鲜组织消化液，55℃水浴/金属浴中消化15 min[d]。组织消化时，务必将组织完全浸没于消化液中。消化完成后，组织外观上仍然完整，但足量的基因组DNA已经释放，不影响后续的PCR实验。

b. 小鼠不同组织样本取样大小参考范围如下：
尾巴或脚趾：1-2 mm或3-5 mg；耳朵：小于5 mm^2或3-5 mg；脏器：小于20 mm^2。
c. 若从3个月以上的小鼠组织提取DNA， 可增加消化液体积至200 μL或适当延长消化时间。
d. 如果目的基因为难扩增基因，建议延长消化时间至30 min。

1.3. 将样本置于95℃水浴/金属浴中孵育5 min以灭活消化液中的蛋白酶。12000 rpm离心5分钟，取上清作为PCR模板。消化后的上清可于-20℃保存三个月[e]。

e. 为保证PCR扩增效率尤其是对于难扩增基因，PCR模板需尽快使用。

2. PCR扩增

2.1. PCR反应体系：
反应体系的配制最好于低温环境下（如冰浴）完成，以保证PCR扩增效率和扩增特异性。

PCR 反应组分	20 μL 反应体系 (μL)	50 μL 反应体系 (μL)
ddH_2O	8	21
正向引物 (10 μM)	0.5	1
反向引物 (10 μM)	0.5	1
模板（消化产物）[f]	1	2
2 x M-PCR OPTI™ Mix	10	25

f: 可以适当增减模板量，以增加目的条带亮度或降低非特异性杂带扩增。

2.2 PCR程序设置：

Temperature (°C)	Time	Cycles
94	5 min	1
94	20 sec	35
50-65	30 sec	
72	X min (2 kb /min)	
72	5 min	1
12	--	1

3. 琼脂糖凝胶电泳

试剂2 x M-PCR OPTITM Mix中含有溴酚蓝染料，PCR产物可直接点样进行琼脂糖凝胶电泳。PCR产物的3’端带有碱基A，可直接克隆至T载体，用于DNA测序。

常见问题及对策

常见问题	可能原因	对策
样本组与阳性对照组均无扩增条带	长期存储或存储条件不当导致试剂失活	使用新的试剂盒
	引物质量问题	重新设计合成引物
	退火温度过高	建议每2℃为一个梯度降低退火温度，摸索最佳条件
	延伸时间过短或循环数过少	适当增长延伸时间或提高循环数至36-40 Cycles
样本组无扩增条带而阳性对照组正常	未充分消化组织样本	将消化时间延长至30 min
	加入过多模板抑制PCR	降低模板用量
	未完全灭活蛋白酶活性	消化产物在95℃加热5 min
有非特异性扩增条带	PCR引物错配	重新设计PCR引物
	PCR体系配制不当（引物浓度或DNA模板浓度过高）	适当降低引物和模板用量
	PCR反应条件设置不当（退火温度过低或循环数过高）	适当提高退火温度或降低循环数
	配制PCR体系时环境温度过高或体系配制完成到PCR仪反应间隔时间过久	在冰浴环境下配制PCR反应体系，完成后尽快放入PCR仪中开始反应
阴性对照出现目的条带	PCR试剂或操作工具污染	使用新的试剂，重新高压灭菌ddH_2O和PCR用品。操作过程中动作尽量轻柔，避免加样溅出污染其他样品
实验结果重复性不好	试剂活性不稳定或DNA模板降解	低温保存所有试剂，重新提取样本基因组DNA
	样本DNA交叉污染	建议每个取样器只取一个样本，或取完一个样本后，将取样器刃口浸没在75%酒精或2%次氯酸钠溶液中反复涮洗，用干净的纸巾擦干后，再取下一个样本
	PCR产物交叉污染	操作过程中动作尽量轻柔，避免管中PCR产物溅出污染其他样品。电泳上样过程中，小心加入适量PCR产物到相应泳道中，避免上样过多溢出或动作过大而污染相邻泳道样品。注意勤换枪头以避免产物交叉污染