



Blood SuperDirect™ PCR Kit(UNG)-EDTA

Cat.No.TP-0412T/04121/04122/04123

For direct PCR using whole blood anticoagulated with EDTA

For performing PCR directly without prior DNA purification

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
● 血液直接 PCR 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 2x 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。

2x SuperEasy™ Mix-EDTA 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。

2x SuperEasy™ Mix(UNG)在 2x SuperEasy™ Mix 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。
- ◆ 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 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 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA，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 EDTA 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≤1kb；超过 1kb，扩增效率下降或者扩增失败。
- ◆ PCR 产物如用于测序建议先进行 PCR 产物纯化。
- ◆ PCR 产物可能会有点突变，如用于基因克隆，请知悉。
- ◆ 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

按照福际生物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)-EDTA EDTA 抗凝全血直接 PCR 试剂盒-UNG				
试剂盒组成	TP-0412T	TP-04121	TP-04122	TP-04123
	50 次	200 次	500 次	2000 次
2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

储存条件

1. 运输条件

全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于 < 4°C 状态。

2. 保存条件

本试剂盒保存在 -20°C。

- ❖ 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA，若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。
- ❖ 6x 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)-EDTA:** 在 2x SuperEasy™ Mix-EDTA 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。包含福际生物特别改造的 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)-EDTA 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。

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)-EDTA 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)-EDTA 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。

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 EDTA 抗凝全血或纯化的 DNA。
- ◆ 0.2ml 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 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 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 200μl PCR 管内加入相应的 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA、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 2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 稀释至 1x(体系配制见下表 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 xg 离心 2min，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 6x 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)-EDTA	10μl	25μl	1x
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{1*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{1*}
抗凝全血 ^{2*}	Xμl	Xμl	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X)μl	(23-X)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*: 通常引物终浓度为0.2μM可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在0.1-0.5μM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1-4mm的血点,直接加入20-50μl PCR反应体系进行扩增。

注意: 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)-EDTA 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 TM 值高 2°C。

2*: 1kb 以内的 DNA 片段,建议延伸时间为 30sec。

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，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行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2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA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
2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA	10μl	25ul	1x
Forward Primer (10μM) ^{1*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) ^{1*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Template(DNA) ^{2*}	Xμl	Xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X)μl	(23-X)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

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(请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。将使用的移液器枪头浸泡在相应2x SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA中，添加引物，ddH₂O进行PCR扩增；另取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染和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)-EDTA	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	

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 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。

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 ● 福际

World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

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

