



Mouse Tail Direct PCR Kit

Cat.No.TP-0133T/01331/01332/01333

For mouse direct PCR using mouse tissue (tail or ear)

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

For research use only



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	3
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
● 鼠尾直接 PCR 操作步骤	8
PCR 对照反应	10
操作示意图	11
问题分析指南	12

产品介绍

本产品采用独特的裂解缓冲液体系可以快速的从小鼠鼠尾、鼠耳、肌肉等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。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65°C 条件下 10-30 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。

2× M1-PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Foregene D-Taq DNAPolymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

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。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量小，少到 5mg 小鼠组织或 2-5mm 鼠尾即可进行实验。
- ◆ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ◆ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：小鼠鼠尾、鼠耳、肌肉等组织。
- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因型鉴定、动物基因分型等。

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段 $\leq 1\text{kb}$ ；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。
- ◆ 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)，每一批次的鼠尾直接 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

Mouse Tail Direct PCR Kit					
鼠尾直接 PCR 试剂盒					
试剂盒组成		TP-0133T	TP-01331	TP-01332	TP-01333
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer MP	5ml	20ml	50ml	100mlx2
	Foregene Protease Plus	220µl	880µl	1.1mlx2	8.8ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x M1-PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
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 Part I、Part II 处于 < 4°C 状态。

2. 保存条件

本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C。

- ❖ 试剂 Buffer MP，在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。
- ❖ 试剂 Foregene Protease Plus，具有独特配方，为保证其更好的活性和稳定性，请保存于 4°C。
- ❖ 试剂 6x DNA Loading Buffer，可置于 4°C 或 -20°C 长期保存。

本试剂盒 Part II 保存在 -20°C。

- ❖ 试剂 2x M1-PCR Easy™ Mix，若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer MP: 提供小鼠组织裂解反应所需的环境。
- ◆ Foregene Protease Plus: 在裂解缓冲液的环境下, 裂解鼠尾或小鼠组织, 释放基因组 DNA。
- ◆ 2x M1-PCR Easy™ Mix: 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, 只需将适当的裂解混合液、引物、ddH₂O 添加到 2x M1-PCR Easy™ Mix 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)

- ◆ 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。
- ◆ 2x M1-PCR Easy™ Mix 应避免反复冻融, 否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高, 2x M1-PCR Easy™ Mix 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。鼠尾直接 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

- ◆ 鼠尾、鼠耳或其他组织(新鲜的、冷冻保存的)。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机($\geq 13,400\times g$)、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、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。
- ◆ Foregene Protease Plus: 增敏剂，刺激性。

操作指南

预防样本间交叉污染

为了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。

鼠尾直接 PCR 操作步骤

A. 样本 DNA 释放

1. 在离心管中加入 100 μ l Buffer MP，4 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。
2. 剪取 2-5mm 鼠尾或 5-10mg 组织放入上述离心管中，轻微涡旋混匀。
注意： 尽量剪碎小鼠组织，以便酶解反应更顺利的进行。
3. 65 $^{\circ}$ C 孵育 10-30min，然后 95 $^{\circ}$ C 处理 5min。
注意： 65 $^{\circ}$ C 孵育，一般只需 10min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难酶解，可以将时间延长至 30min。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。
4. 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 5min。
5. 转移上清至新的离心管，4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

B. PCR 反应鉴定

1. 在 PCR 管内加入相应的 2 \times M1-PCR EasyTM Mix 以及特异引物待用。
2. 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 1-10% 之间最佳，不能超过 20%。如 50 μ l 的 PCR 体系中，加入 0.5-5 μ l 裂解液即可，但不能超过 10 μ l。
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。

4. 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 M1-PCR Easy™ Mix	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*}
裂解混合液(DNA模板) ^{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0.2-0.25μM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*: 裂解产物作为PCR模板，加入量在PCR体系1-10%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：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	94°C	3min	1	预变性
2	94°C	10sec	30-40	变性
3	55-65°C ^{1*}	20sec		引物退火
4	72°C	x min (2kb/min) ^{2*}		延伸
5	72°C	5min	1	终延伸

1*: 2x M1-PCR Easy™ Mix 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 M1-PCR Easy™ Mix有效性。其反应体系的配制见下表3。

表 3: 对照 PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2x M1-PCR Easy™ Mix	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
DNA模板 ^{2*}	xμl	xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-x)μl	(23-x)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

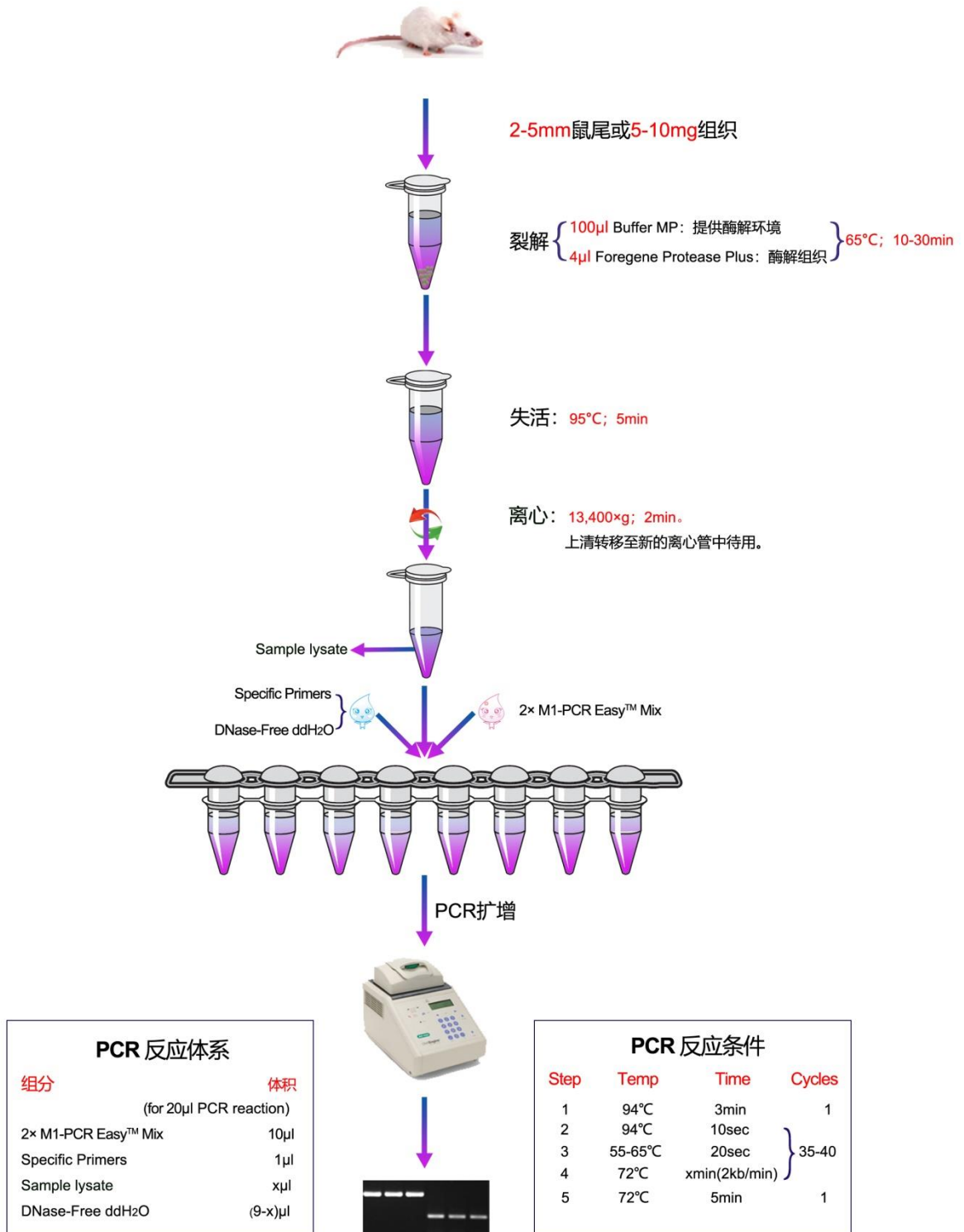
1*: 引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、基因组上的保守序列等(请确保这些引物的可用性)。

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。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



问题分析指南

以下针对鼠尾直接 PCR 系列试剂盒在鼠尾或组织直接 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，下面就分别对使用鼠尾直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在进行直接 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 M1-PCR Easy™ Mix 或 2x M1-PCR Easy™ Mix(UNG)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. PCR 条件没有使用正确。

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

2. 加入组织裂解液过量。

建议：增大反应体系，或减少裂解液的用量。

3. 样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。

建议：裂解混合液可在 4℃保存 2-3 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。

4. 模板加入量不适合。

建议：在反应体系 10-20%范围内优化模板加入量。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。

5. 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. 样本间交叉污染。

建议：每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口浸入 2% 的次氯酸钠溶液中，反复涮洗，然后用干净的纸巾擦干残液。

3. 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)

