



# Mouse Tail Direct PCR Kit - UNG

Cat.No.TP-01341/01343

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	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
● 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 DNA Polymerase、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、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。

2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)在 2× M1-PCR Easy™ 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。

## 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 2-5 mm 鼠尾或 5 mg 小鼠组织即可进行实验。
- ◆ 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。
- ◆ 防污染 PCR 体系 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)，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

- ◆ 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 $\leq$ 1kb；超过 1kb，扩增效率下降或者扩增失败。
- ◆ 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

按照凡晶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 - UNG			
鼠尾直接 PCR 试剂盒-UNG			
试剂盒组成 (100 $\mu$ L 裂解体系 + 20 $\mu$ L PCR 体系)		TP-01341	TP-01343
		200 T	2000 T
Part I	Buffer MP	20 mL	100 mL $\times$ 2
	Foregene Protease Plus	800 $\mu$ L	8 mL
	6 $\times$ DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
Part II	2 $\times$ M1-PCR Easy™ Mix(UNG)	1 mL $\times$ 2	1.7 mL $\times$ 12
说明书		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  $< 4^{\circ}\text{C}$  状态。

### 2. 保存条件

本试剂盒 Part I 保存在常温或  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

- ❖ 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  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。  
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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$ 。
- ❖ 试剂 6 $\times$  DNA Loading Buffer，可置于  $4^{\circ}\text{C}$  或  $-20^{\circ}\text{C}$  长期保存。

本试剂盒 Part II 保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

- ❖ 试剂 2 $\times$  M1-PCR Easy™ Mix(UNG)，若频繁使用，也可置于  $4^{\circ}\text{C}$  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。
- ◆ 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG): 在 2× M1-PCR Easy™ 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, 从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。包含 Foregene 特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、UNG、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、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、ddH<sub>2</sub>O 添加到 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG) 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ 6× DNA Loading Buffer: 该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在琼脂糖凝胶电泳时, 配搭使用试剂盒附赠的 6× 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, 影响实验结果判断。

## 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。
- ◆ 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, 避免样本反复冻融。
- ◆ 若 Buffer MP 有沉淀析出, 可放置于 37℃ 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℃ 存储, 切勿置于 -20℃。
- ◆ 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG) 应避免反复冻融, 否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高, 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG) 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, 影响实验结果判断。

## 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)。
- ◆ 1.5 mL 或 2 mL 无菌离心管、0.2 mL 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  $\mu$ L Buffer MP**， **4  $\mu$ 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 **2-5 mm 鼠尾**或 **5-10 mg 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°C 孵育 10-30 min**， 然后 **95°C 处理 5 min**。  
注意：65°C 孵育，一般只需 10 min 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 30 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。
4. **12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)**离心 5 min。
5. 转移上清至新的离心管，**4°C**或**-20°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 Easy™ Mix(UNG)**以及特异引物待用。
2. 取适量 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  $\mu$ L 的 PCR 体系中，加入 0.5-5  $\mu$ L 裂解液即可，但不能超过 10  $\mu$ 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
2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)	10 μL	25 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM <sup>1*</sup>
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM <sup>1*</sup>
裂解混合液(DNA模板) <sup>2*</sup>	X μL	X μL	
ddH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	(9-X) μL	(23-X) μL	
Total Volume	20 μL	50 μL	

1\*: 通常引物终浓度为0.2-0.25 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μM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：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	94°C	5 min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10 sec	35-40	变性
4	55-65°C <sup>1*</sup>	20 sec		引物退火
5	72°C	X min (2kb/min) <sup>2*</sup>		延伸
6	72°C	5 min	1	终延伸

1\*: 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)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\*: 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。

## 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，都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，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2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)有效性。其反应体系的配制见表3。

**表 3: 对照 PCR 反应体系配制**

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)	10 μL	25 uL	1×
Forward Primer (10 μM) <sup>1*</sup>	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM
Reverse Primer (10 μM) <sup>1*</sup>	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM
DNA模板 <sup>2*</sup>	X μL	X μL	100-200 ng
ddH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	(9-X) μL	(23-X) μL	
Total Volume	20 μL	50 μL	

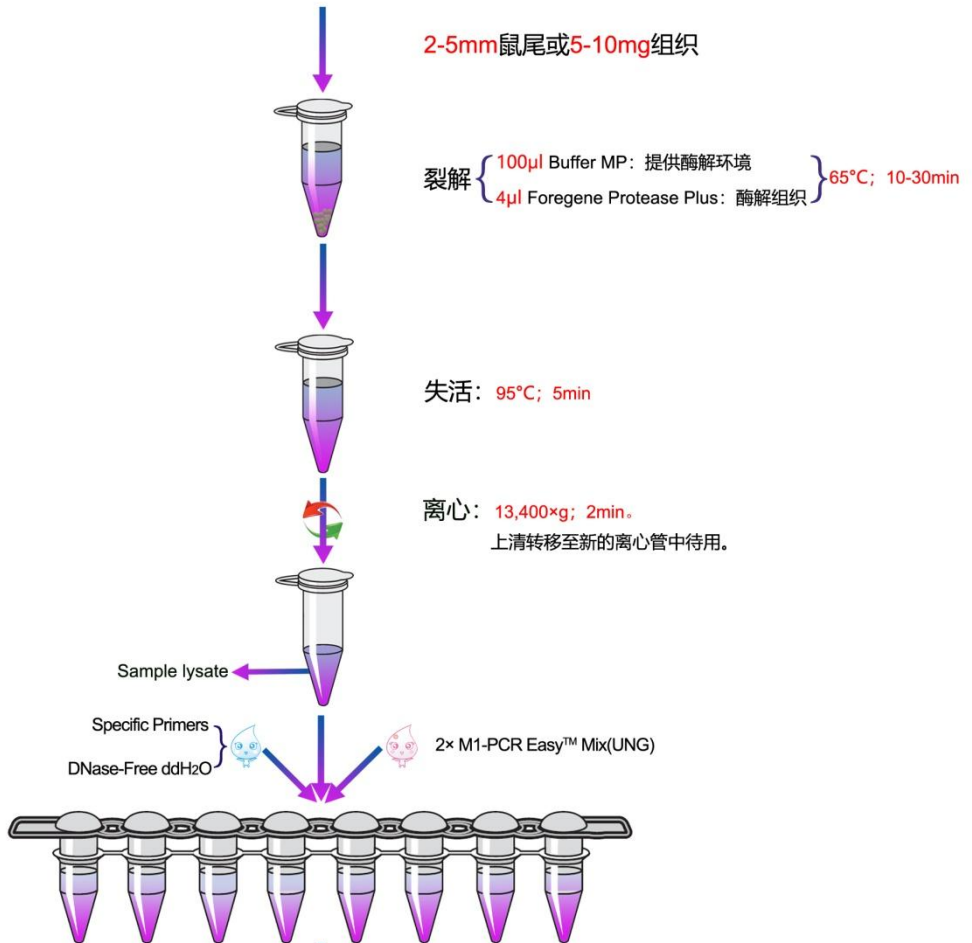
1\*: 引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、基因组上的保守序列等(确保这些引物的可用性)。

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ddH<sub>2</sub>O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



PCR扩增



琼脂糖凝胶电泳检测结果

## PCR 反应体系

组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)	10µl
Specific Primers	1µl
Sample lysate	xµl
DNase-Free ddH <sub>2</sub> 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	1

## 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：2× 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. PCR 条件没有使用正确。

建议：请仔细确认 2× 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  $\mu\text{M}$  可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  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·凡晶      World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话：028-83360257, 028-83361257

E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)

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

