

For research use only

Version Number: 1.1

Blood SuperDirect™ PCR Kit(UNG)-EDTA

For performing PCR directly from whole blood without prior DNA purification

试剂盒组成 (20 µL PCR 体系)	TP-04121	TP-04123
	200 T	2000 T
2× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA	1 mL × 2	1.7 mL × 12
6× DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
说明书	1 份	1 份

产品简介

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。

2× SuperEasy™ Mix-EDTA 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。该试剂包含 Foregene D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、Taq Reaction Buffer、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂。

2× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 在 2× 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(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。

运输及储存条件

- ❖ 运输条件: 全程低温冰盒运输, 保证试剂盒处于<4°C 状态。
- ❖ 保存条件: 保存条件: 试剂盒保存在-20°C。

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。
- ❖ 2× 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。
- ❖ 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 2× 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。

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。
- ❖ 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 应避免反复冻融, 否则会影响 PCR 效率。
- ❖ 如果环境温度过高, 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 可能会变浑浊, 可置于冰上放置 1-2 min, 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。

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)。

操作指南

该试剂盒操作简便，只需取适量抗凝血液加入 2× 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 200 μL PCR 管内加入相应的 2× 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 2× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA 稀释至 1×(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 ×g 离心 2 min，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 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× SuperEasy™ Mix(UNG)-EDTA	10 μL	25 μL	1×
Forward Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM ^{1*}
Reverse Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM ^{1*}
抗凝全血 ^{2*}	X μL	X μL	
ddH ₂ 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*：若模板使用含有血液的采集卡，可截取直径 1-4 mm 的血点，直接加入 20-50 μl 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	3 min	1	预变性
3	94°C	10 sec	30-40	变性
4	55-65°C	20 sec		引物退火
5	72°C	X min (2 kb/min) ^{2*}		延伸
6	72°C	5 min	1	终延伸

1*：2× 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*：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，伸时间等。