

For research use only

Version Number: 1.0

## QuickEasy™ Mouse Tail Direct PCR Kit -UNG (With Dye)

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

试剂盒组成 (100 µL 裂解体系 + 20 µL PCR 体系)		DP-01011	DP-01012
		200T	2000T
Part I	Buffer MP	20 mL	100 mL x 2
	Foregene Protease plus	800 µL	8 mL
Part II	2x Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye)	1 mL x 2	1.7 mL x 12
说明书		1 份	1 份

### 产品简介

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。PCR Mix 添加专门用于 Direct PCR 的热启动 Taq 酶 (Direct HS-Taq)，可大幅度提高 PCR 扩增特异性，增强结果判读。

PCR 完成后可直接上样电泳，无需再混 Loading Buffer。

### 运输及储存条件

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 Part I 保存在 2-8°C；Part II 保存在 -20°C。

### 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 5 mg 小鼠组织或 2-5 mm 鼠尾即可进行实验。
- ◆ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ◆ Direct HS-Taq 引入直接 PCR 体系，提高 PCR 特异性，增加结果判读。
- ◆ 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 2x Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye)，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 Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye) 避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 如果环境温度过高，2x Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye) 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。

### 预防样本间交叉污染

为避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刀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。

## 操作指南

### A: 样本 DNA 释放

- 在离心管中加入 100  $\mu\text{L}$  Buffer MP, 4  $\mu\text{L}$  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。

- 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。

- 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。

- 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 5 min。

- 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

- 在 PCR 管内加入相应的 2 $\times$  Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye) 以及特异引物待用。

- 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  $\mu\text{L}$  的 PCR 体系中, 加入 0.5-5  $\mu\text{L}$  裂解液即可, 但不能超过 10  $\mu\text{L}$ 。

- 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。

- 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 1: PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 $\times$ Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye)	10 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	1 $\times$
Forward Primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.2-0.25 $\mu\text{M}$ <sup>1*</sup>

Reverse Primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.2-0.25 $\mu\text{M}$ <sup>1*</sup>
裂解混合液(DNA模板) <sup>2*</sup>	X $\mu\text{L}$	X $\mu\text{L}$	
ddH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	(9-X) $\mu\text{L}$	(23-X) $\mu\text{L}$	
Total Volume	20 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	

1\*: 通常引物终浓度为 0.2-0.25  $\mu\text{M}$  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。

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	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 (2kb/min) <sup>2*</sup>		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1\*: 2 $\times$  Mouse Direct PCR Mix(HS)-UNG (dye) 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 T<sub>M</sub> 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。