

T5 Direct PCR Kit(Blood)

目录号

TSE009

产品简介

本产品是一款专为血液样品直接扩增设计的试剂盒,适用于新鲜血液、4℃贮存血液、冷冻血液以及储存在Whatman 903®和FTA®商用卡上的干血渍等多种血样,且兼容所有常规抗凝剂(EDTA、柠檬酸盐、肝素等),可以全血为模板扩增长达8 kb的基因组片段。产品中所含的T5 Blood DNA Polymerase是在T5 DNA Polymerase基础上改造而来,具有优良耐受血液样品中抑制剂的能力,特殊的DNA-Binding结构Sso7d蛋白结构域的融合使其具有超快的延伸速度,同时基于*lacZα*法测试,该酶的保真度为野生型*Taq* DNA聚合酶的20倍。

本产品为2×浓度的PCR直扩预混液,已包含合适浓度的Mg²⁺、DNA聚合酶和dNTPs,使用时只需添加模板和引物,并补水至1×浓度即可进行反应。使用本试剂盒扩增的产物为平末端,纯化后可用于后续克隆(推荐T载体目录号:TSV-007B)、酶切、测序及文库构建等实验。

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

产品组成

组分	规格
2×T5 Direct PCR Mix (Blood)	5×1.0 mL
MgSO ₄ (50 mM)	1×1.0 mL
Lysis Buffer A	1×10 mL
Positive Control Primer Mix (Sox21)(10 μM each)	100 μL

产品应用

适用于新鲜血液、4℃贮存血液、冷冻血液以及储存在Whatman 903®和FTA®商用卡上的干血渍等多种血样的直接扩增。

产品特点

- 无需提取基因组DNA,操作简便,省时省力;
- 改造的T5 Blood DNA Polymerase,具有极高的抑制物耐受度,保真度为野生型*Taq* DNA聚合酶的20倍;
- 快速扩增,延伸速度高达10 s/kb;
- 适用于各种血液样本,兼容常规抗凝剂。

使用方法

1. 推荐PCR反应体系

将2×T5 Direct PCR Mix (Blood)从-25~-15℃取出后置于冰上解冻,完全解冻后上下颠倒混匀。按照如下方法配制反应体系:

组分	50 μL体系	终浓度
2×T5 Direct PCR Mix (Blood)	25 μL	1×
上游引物 (10 μM) ^a	2 μL	0.4 μM
下游引物 (10 μM) ^a	2 μL	0.4 μM
血类样品 ^b	见标注	
ddH ₂ O	Up to 50 μL	

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

注:各组分使用前应充分混匀,体系配制完成后,应充分混匀并短暂离心后上机。

a. 引物:为提高产物特异性与扩增成功率,建议引物长度为25 bp以上,GC含量以40~60%为宜;扩增效果不佳时,可在0.2~0.8 μM范围内调整引物终浓度;

b. 血类样品

b-1. 若为血液样品,直接吸取血液作为模板即可进行扩增。全血模板加入量范围为总体系的1%~20%,推荐使用5%作为初始尝试条件,加入量大于10%时,使用较大体系(50 μL)进行扩增;吸取抗凝血,尤其是长期存放过的抗凝血时,应尽量避免吸取血液凝块;

b-2. 若为贮存在Whatman®滤纸卡上的干血渍,可取约1 mm²带血渍的圆纸片,将其直接放入PCR反应液中即可进行扩增;

b-3. 若干血渍需要溶解或一个样品需要进行多个反应时,可用Lysis Buffer对样品进行前处理。对于干血渍,可用50 μL Lysis Buffer浸泡并于60℃孵育5 min;对于需要稀释的全血,如禽类血液DNA含量丰富,也可用Lysis Buffer进行不同程度的稀释,取稀释液作为模板进行扩增;

c. 在2×T5 Direct PCR Mix (Blood)中已包含终浓度为2.5 mM的MgSO₄,本试剂盒中配备了50 mM MgSO₄用于调整反应体系中的镁离子浓度,如需要调整,推荐以0.2 mM为梯度,以找到最佳反应浓度。高浓度的镁离子会增强非特异性扩增,可通过添加50 mM EDTA(自备)来降低镁离子浓度。

2. 推荐PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98℃	3 min	1
变性	98℃	10 s	35~40 ^d
退火 ^b	Tm+3~5℃	10 s	
延伸 ^c	72℃	10~30 s/kb	1
终延伸	72℃	3~5 min	
保存	4~12℃	∞	

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

- a. 预变性:预变性98℃ 3 min可使大部分细胞释放出DNA, 请勿缩短时间或降低温度;
- b. 退火温度:参考引物Tm值, 建议退火温度设置为引物中Tm较小值+3~5℃; 如扩增产物特异性较差, 或上下游引物Tm值相差较大, 可先进行退火温度梯度预试验以得到最适退火温度, 或尝试用Touchdown PCR程序进行扩增;
- c. 延伸时间:简单模板按照10 s/kb设置即可, 对于长片段或高GC等复杂模板, 可将延伸速度调整为20~30 s/kb, 以保证较高的扩增效率及产量;
- d. 扩增循环数:通常来说, 35个循环可扩增足量产物, 若扩增产量偏低, 可增加循环数至40。

3. 扩增产物鉴定

扩增产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳, 无需添加Loading Buffer。

对扩增产物进行1~3 min离心, 取上清液进行电泳, 可消除全血中多种成分对电泳分析的干扰, 这一步骤对加入较多血液作为模板的扩增产物更为必要。

4. 阳性对照引物

试剂盒内包含引物预混液Positive Control Primer Mix (Sox21)(10 μM each), 可用于阳性对照反应。

阳性对照引物为Sox21-F/R, 可从哺乳动物基因Sox 21上游保守序列中扩增出长为237 bp的片段。

阳性对照引物扩增时推荐使用退火温度范围为55~70℃。

引物名称	引物序列
Sox21-F	AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG
Sox21-R	GCACTCCAGAGGACACRGRTGTCAATA

■ 注意事项

- 建议使用新鲜的血液样品, 尽量避免因长期储存或反复冻融导致的基因组DNA的降解。

- 阳性对照引物仅适用于哺乳动物样本, 不适用于鱼类、禽类等其他动物。
- PCR Mix应避免反复冻融, 短期内多次使用可置于2~8℃保存。

■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
阳性对照片段、目的片段均无扩增	模板过量	可在正式实验前先进行模板梯度扩增, 选择最合适的模板用量
	样品不新鲜	建议使用新鲜的样品, 避免长期储存或反复冻融导致的基因组DNA的降解
	试剂保存不当	使用新的试剂盒, PCR Mix长期保存应在-25~-15℃, 使用时应避免反复冻融
	引物质量差	做纯化的基因组模板的对照反应, 验证引物质量, 若仍然无法扩增可重新设计合成引物
	操作失误	重复实验, 确认操作、循环参数无误
阳性对照片段扩增正常, 目的片段无条带或条带弱	引物质量差	做纯化的基因组模板的对照反应, 验证引物质量, 若无法正常扩增可重新设计合成引物
	退火温度不合适	做退火温度梯度PCR (推荐以2℃为梯度), 摸索最佳反应条件
	延伸时间过短	增加延伸时间
	循环数过低	增加5~10个循环数
非特异性扩增	DNA模板量不足	适当增加模板用量
	退火温度过低	提高退火温度或尝试Touchdown PCR程序
	延伸时间过久	缩短延伸时间 (非特异条带大于目的片段时适用)
	循环数过高	减少循环数
	模板用量过高	减少模板用量或将模板稀释后扩增
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	引物特异性差	适当延长引物或重新设计引物

产物呈现高/低分子量弥散条带	退火温度不合适	做退火温度梯度PCR (推荐以2℃为梯度), 摸索最佳反应条件
	模板用量不合适	可在正式实验前先进行模板梯度扩增, 选择最合适的模板用量
	循环数过高	减少循环数
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	延伸时间过久	适当缩短延伸时间 (高分子量弥散条带适用)
阴性对照扩增出目的条带	体系杂质含量高	扩增产物离心后取上清液进行电泳
	引物质量差	重新设计引物 (低分子量弥散条带适用)
	环境或气溶胶污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液 (目录号: TSPO01) 对操作环境及空气进行清洁处理
	PCR体系污染	使用无菌耗材, 及时更换枪头

■ 保存条件

-25~-15℃保存, 保质期2年, 干冰运输。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。

