

T5 Direct PCR Kit (Animal Tissue)

目录号

TSE012

产品简介

本产品是一款专为动物组织、细胞样品直接扩增设计的试剂盒,适用于2 kb以内DNA片段的扩增。样品经过简单的裂解处理即可作为PCR扩增模板,无需进行基因组DNA的提取,使用更加简便。产品中所含的T5 PolStar DNA Polymerase,为针对动物来源模板优化的高保真DNA聚合酶,是在具有校正活性的高保真DNA聚合酶基础上改造而来,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。产品中特别添加特异性增强因子SuperPrime及延伸增强因子Extension Ehancer,搭配优化的反应缓冲液可减少扩增条件探索,极大地节省时间。

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:T5V-007B)、酶切、测序及文库构建等实验。

产品组成

组分	规格
2×T5 Direct PCR Mix (Animal Tissue)	5×1.0 mL
5×High GC Additive	2×1.0 mL
Lysis Buffer A	1×10 mL
Dilution Buffer B	1×10 mL
Positive Control Primer Mix (Sox21)(10 μM each)	100 μL

产品应用

适用于动物组织、细胞等样品的直接扩增,可用于动物基因敲除分析、转基因检测等鉴定型实验,同时适用于对保真性要求较高的基因克隆等实验。

产品特点

- 无需提取基因组DNA,操作简便,省时省力;
- 改造的T5 PolStar 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;
- 适用于多种动物组织样品。

使用方法

1. 基因组DNA的释放

适用样品:适用于鼠尾、鼠耳、昆虫、线虫、鱼鳍和表皮、毛发等动物样品,同时适用于唾液、羊水等含细胞的体液或收集的悬浮细胞;新鲜或者冷冻样品均适用。

使用方法:取直径0.5~2 mm的动物组织样品或5~10 μL体液/细胞液(细胞

样品推荐用量为10⁴~10⁵个),放入离心管内并加入50 μL Lysis Buffer A,95℃加热10 min(较难裂解的样品可适当增加裂解时间),震荡后瞬时离心,取上清液1~3 μL为模板进行PCR扩增(杂质含量较高时,可取适量上清液与等体积的Dilution Buffer B混匀后,取1~3 μL为模板进行PCR扩增)。
注:对于难以裂解或比较坚硬的样品,可提前通过液氮研磨、捣碎或蛋白酶消化等方法进行预处理,帮助DNA更好的释放。裂解操作中需确保样品完全浸入到裂解液中,而非粘在管壁上。



鼠尾样品推荐取样量(参照物:10 μL枪头)示意图

2. 推荐PCR反应体系

将2×T5 Direct PCR Mix (Animal Tissue)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 (Animal Tissue)	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
裂解产物 ^b	1~3 μL	
灭菌水	Up to 50 μL	

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Tm值为65~70℃,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. 裂解产物:加入量过高时,抑制物会影响扩增效果。可在正式试验前先行进行模板量梯度扩增预试验,挑选出最合适的模板量;

c. 试剂盒中配有5×High GC Additive,扩增高GC片段(片段整体或局部GC含量>65%)时添加,可显著提高扩增效率。使用时终浓度调整为1×,即50 μL体系中需加入10 μL本组分。

3. 推荐PCR反应程序

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

a. 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;

b. 延伸时间:简单模板按照10 s/kb设置即可,对于高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;

c. 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。

4. 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。

5. 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Sox21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	GCACTCCAGAGGACAGCRGTGTCAATA

■ 注意事项

- 为避免样品间出现交叉污染，需准备多个取样工具，如需反复使用可在每次取样后用2%次氯酸钠溶液或Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSP001)对工具表面进行清洁处理，确保每一单独样品均使用无污染的取样器材；
- 建议使用新鲜的样品，尽量避免因长期储存或反复冻融导致的基因组DNA的降解。取样量不宜过大，以避免影响扩增结果；
- 动物组织经热裂解处理后，可能不会也无需完全溶解，振荡可以促进DNA释放，静置或者离心后取上清液扩增即可；
- 为保证实验效果，建议每次扩增均使用新鲜裂解产物为模板；
- 阳性对照引物仅适用于哺乳动物样本，不适用于鱼类、昆虫等其他动物；
- 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	裂解产物过量	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，一般不超过体系的1/10
	取样量过大，模板杂质含量高	将裂解产物稀释10倍后扩增，或减少取样量重新裂解
	组织样品不新鲜	建议使用新鲜的组织样品，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，一般不超过体系的1/10
	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)
	体系杂质含量高	电泳前离心取上清(低分子量弥散条带适用)
阴性对照扩增出目的条带	引物质量差	重新设计引物(低分子量弥散条带适用)
	样品间交叉污染	每个取样器只取一个样品，或取完后用2%次氯酸钠溶液或Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSP001)对工具表面进行清洁处理
	环境或气溶胶污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSP001)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。

