

Trelief® Mouse Direct PCR Kit (for Genotyping)

■ 目录号

TSE014

■ 产品简介

本产品是一款专为小鼠组织直接扩增设计的试剂盒，小鼠组织（尾巴、耳朵、脚趾等）经过简单的裂解处理即可作为PCR扩增模板，无需过夜消化、酚氯仿抽提或柱式纯化等操作，使用更加简便。产品适用于2 kb以内目的片段的扩增以及3对引物以内的多重PCR反应。

本产品所提供的2×Mouse Direct PCR Mix中，包含经过基因工程改造的DNA聚合酶、合适浓度的Mg²⁺、dNTPs以及优化的缓冲体系，具有极高的扩增效率和抑制物耐受度，使用时只需加入模板和引物，并补水至1×即可进行PCR反应。

■ 产品组成

组分	规格
2×Mouse Direct PCR Mix	5×1.0 mL
Lysis Buffer	4×20 mL
DNA Release	2×800 μL
Positive Control Primer Mix (Sox21)(10 μM each)	100 μL

01

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

■ 产品应用

用于小鼠基因敲除分析、转基因检测、基因分型等。

■ 产品特点

- 无需复杂的基因组提取步骤，操作简便，省时省力；
- 改造的DNA聚合酶，具有极高的扩增效率和良好的抑制物耐受度；
- 添加特异性增强因子，扩增产物具有高特异性；
- 适用于多种小鼠组织的直接扩增。

■ 使用方法

1. 基因组DNA的释放

1) 裂解液配制

根据要裂解的小鼠样品数量配制组织裂解液，单个样品所需试剂比例如下：

组分	单个样品所需
DNA Release	4 μL
Lysis Buffer	200 μL

注：组织裂解液应现用现配，且充分混匀后使用。

2) 小鼠样品准备与裂解

推荐组织使用量：

组织类型	小鼠尾尖	小鼠耳朵	小鼠脚趾
推荐用量	1~3 mm	2~5 mm ²	1~2个

准备推荐用量的小鼠样品置于干净的离心管中，向每个含有小鼠样品的离

02

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

心管中加入200 μL新鲜的组织裂解液，涡旋震荡后在55°C下孵育30 min，然后98°C加热处理3 min。

(为保证模板释放量，请将组织完全浸没到裂解液中。裂解结束后组织块可能并未完全消化，残余部分可通过后续离心去除。)

3) 离心处理

将裂解产物充分震荡混匀，12,000 rpm离心5 min，取上清即可作为模板直接用于PCR扩增。模板如需保存，可将上清转移至另一个无菌离心管中，并置于-25~-15°C保存备用，保存时间为2周。

2. 推荐PCR扩增反应体系

将2×Mouse Direct PCR Mix从-25~-15°C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	25 μL体系	50 μL体系	终浓度
2×Mouse Direct PCR Mix	12.5 μL	25 μL	1×
上游引物 (10 μM) ^a	1 μL	2 μL	0.4 μM
下游引物 (10 μM) ^a	1 μL	2 μL	0.4 μM
裂解产物 ^b	0.5~1 μL	1~2 μL	
ddH ₂ O	Up to 25 μL	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：扩增效果较差时，可在0.2~0.8 μM范围内调整引物终浓度；

b. 裂解产物：加入量不应超过体系的1/10，加入量过高时，抑制物会影响扩增效果。可在正式实验前先行模板梯度扩增预试验，挑选出最适合的模板量。

3. 推荐PCR反应程序

03

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	5 min	1
变性	94°C	30 s	35 ^c
退火 ^a	Tm+3~5°C	30 s	
延伸 ^b	72°C	30 s/kb	
终延伸	72°C	7 min	1
保存	4~12°C	∞	

- 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°C;
b. 延伸时间:延伸速度为30 s/kb,若目的片段长度不足1 kb,则按30 s设置;
c. 扩增循环数:35个循环可扩增足量产物,若循环过多会导致非特异性增加。

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),上下游引物浓度均为10 μM,可用于阳性对照反应。

阳性对照引物为Sox21-F/R,可从小鼠基因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°C。

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

■ 注意事项

- 为了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:TSPO01)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。

- 建议使用新鲜采取的小鼠组织,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。
- Lysis Buffer的保存条件为2~8°C,若出现沉淀,在使用前务必充分溶解(可在37°C水浴以溶解沉淀)。
- PCR Mix应避免反复冻融,短期内多次使用可置于4°C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°C,使用时应避免反复冻融
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,若仍然无法扩增可重新设计合成引物
	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,若无法扩增可重新设计合成引物
	退火温度过高	做退火温度梯度PCR(推荐以2°C为梯度),摸索最佳反应条件
	延伸时间过短	增加延伸时间
非特异性扩增	DNA模板量不足	适当增加模板用量或增加循环数
	退火温度过低、循环数过高	提高退火温度,减少循环数
	模板浓度太高	减少模板用量或将模板稀释10倍后扩增
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	引物特异性差	重新设计引物

阴性对照扩增目的条带	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:TSPO01)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: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

Lysis Buffer 2~8°C保存,其余组分-25~-15°C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。

