

Mouse Tissue Direct PCR Kit (With Dye)

小鼠组织直接 PCR 试剂盒

产品简介

本试剂盒可直接快速地对小鼠组织（如鼠尾、鼠耳、鼠趾、肌肉等）样本进行 PCR 扩增，具有极强的样本兼容性。本试剂盒配备了强力的裂解缓冲液，可以快速裂解样品，释放基因组 DNA。裂解液可以直接加入到 PCR 反应体系中，无需精纯化，操作方便。此外，本试剂盒对样品投入量要求低，5 mg 小鼠组织或 1-5 mm 鼠尾即可进行实验。

本试剂盒提供的 2× Mouse Direct PCR Mix 为 2 倍浓度的热启动 PCR 反应液，包含了用于 PCR 扩增除模板和引物外的所有组分，大大简化操作过程，降低污染几率。且含有示踪染料，PCR 产物可直接电泳。

该试剂盒可用于**转基因鉴定、小鼠基因分型**等。

产品信息

货号	10185ES50 / 10185ES70
规格	50 T / 200 T

组分信息

组分编号	组分名称	10185ES50	10185ES70	储存条件
10185-A	Buffer ML	1×5 mL	20×1 mL	2-8°C
10185-B	Buffer MT	0.6 mL	1.25×2 mL	-25~-15°C
10185-C	2× Mouse Direct PCR Mix	500 μL	1×2 mL	-25~-15°C

a) Buffer ML 为裂解缓冲液，包含强力蛋白变性剂，请戴手套操作。

b) Buffer MT 为终止缓冲液，用于终止 Buffer ML 的裂解功能。

c) 2× Mouse Direct PCR Mix: 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂、稳定剂和电泳指示染料等。

储存条件

- 试剂 10185-A【Buffer ML】，2-8°C 保存。如长时间未使用，请分装冻存，避免交叉污染。
- 试剂 10185-B【Buffer MT】，-25~-15°C 保存，避免反复冻融。
- 试剂 10185-C【2× Mouse Direct PCR Mix】，-25~-15°C 保存，避免反复冻融。

试剂盒有效期 1 年。

使用说明

样品基因组 DNA 释放

- 剪取 5-10 mg 动物组织或 1-5 mm 鼠尾，置于 1.5 mL 离心管中；
- 在上述离心管中加入 90 μL Buffer ML，轻轻涡旋使得样品完全被裂解液浸润，短暂离心；
- 在恒温孵育仪中设置 95°C 孵育 15 min；
- 加入 10 μL Buffer MT，轻弹混匀，终止裂解；
- 选做步骤：12,000 rpm 离心 2 min；

6. 将上清转移至新的离心管，4°C或-20°C保存或直接取上清用于后续 PCR 扩增。

*组织应尽量剪碎，以便裂解反应更顺利进行。

**95°C孵育，一般 15 min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难裂解，可将时间延长至 30 min。组织块不需完全裂解，残余的部分在后续离心步骤中可被除去。

PCR 反应鉴定——PCR 反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Mouse Direct PCR Mix	10	1×
Forward Primer (10 μM)	0.5	0.2-0.4 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.5	0.2-0.4 μM
裂解产物 (DNA 模板)	1	-
无菌超纯水	To 20	-

表 1 PCR 反应体系

【注】：各组分使用前应充分混匀。

- 模板用量：建议按 1-10%总体积量取用模板，20 μL 体系建议采用 1 μL 上清液作为模板；
- 引物终浓度：0.2-0.4 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度；
- 反应体系：推荐使用 20 μL，也可根据使用习惯调整体系体积大小；
- 体系配制：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。

PCR 反应鉴定——PCR 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	5 min	1
变性	94°C	10 sec	35***
退火*	60°C	20 sec	
延伸**	72°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

表 2 PCR 反应程序

*退火温度：请参考引物的理论 Tm 值，退火温度可设置低于引物理论值 2-5°C，或通过梯度 PCR 确定最佳温度。

**延伸时间：请按 30 sec/kb 设定。

***扩增循环数：35 个循环已可以扩增足量产物。

电泳上样：取 3-5 μL 扩增产物上样即可。

对照反应：在 PCR 结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，建议在进行 PCR 时，设置阳性和阴性 PCR 对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

注意事项

- 为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃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。
- 建议使用新鲜采取的动物组织，若为长期冷冻组织，应尽量避免反复冻融，否则会导致模板的降解，影响 PCR 效率。
- 建议扩增片段长度 1 kb 以内，以便扩增效率最佳。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅作科研用途！

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、待测样本均无条带。	PCR 反应体系或反应条件不合适。	使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。
	PCR 试剂保存不当失去活性。	2×PCR Mix 应保存于-25~-15℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 2-8℃短时间存放。
	引物设计问题。	尝试重新设计引物进行检查。
阳性对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱。	不当储存或长期储存引起试剂活性丧失。	使用新鲜的试剂。
	加入组织裂解液过量。	增大反应体系，或减少裂解液的用量。
	样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。	裂解混合液可在 2-8℃保存 2-3 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。
	模板加入量不适合。	在反应体系 1-10%范围内优化模板加入量。
	PCR 循环数不足。	适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。
非特异性扩增	PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高。	提高 PCR 退火温度，降低 PCR 循环数、引物浓度或模板浓度。
	PCR 引物错配。	重新设计 PCR 引物。
	配制 PCR 反应体系时温度太高或配制完成后放置时间太久。	PCR 反应体系的配制在低温下进行，配制完成后尽快进行 PCR 扩增反应。
阴性对照出现目的条带	操作工具或试剂污染。	实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。
	样本间交叉污染。	每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口浸入 2%的次氯酸钠溶液中，反复涮洗，然后用干净的纸巾擦干残液。