

One Step Mouse Genotyping Kit

PD101-01

Version 9.2



Vazyme biotech co., Ltd.

产品概述

本试剂盒包含整套的DNA粗提取以及PCR扩增体系，适用于小鼠基因型快速鉴定(Rapid Genotyping)。本试剂盒可用于从小鼠尾巴、耳朵以及脚趾等组织中快速释放基因组DNA，产物可直接进行PCR扩增，无需匀浆、破碎、过夜消化、酚氯仿抽提、DNA沉淀或柱式纯化等操作，极大缩短了实验耗时。使用时，将组织浸泡在预添加了Proteinase K的裂解液中，55°C孵育20 min后95°C加热5 min灭活Proteinase K。裂解产物经离心后可直接用做PCR扩增模板，经反复测试广泛适用于2 kb以内目标片段扩增，并适用于4对引物以内的多重PCR反应。

试剂盒中配有2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)，包含高性能的Taq Plus DNA Polymerase，dNTP以及优化的缓冲体系。PCR反应时只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了开管/移液等操作，显著降低了样品交叉污染并且提高了检测通量和结果的重现性。独特的保护剂使得Taq Plus Master Mix经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。体系中预混有电泳缓冲液和染料，可在反应结束后直接进行电泳，使用方便快捷。PCR产物的3'端带A，可克隆至T载体，并适用于ClonExpress®和拓扑克隆试剂盒(C112/C113/C115/C601)。

产品组分

组 分	PD101-01 200 rxn (50 µl/rxn)
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	40 ml
Proteinase K	800 µl
2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)	5 ml
25 mM MgCl ₂	500 µl
5 × PCR Enhancer ^a	2 ml

a. 用于PCR扩增产物GC含量较高时添加

保存条件

1 × Mouse tissue Lysis Buffer 2 ~ 8°C保存；其余组分-30 ~ -15°C保存。-20 ~ 0°C运输。

应用范围

- 小鼠基因分型
- 小鼠转基因检测
- 小鼠基因敲除分析

质量控制

50 µl PCR反应体系中，以2 µl小鼠尾巴裂解产物为模板，扩增小鼠p53基因。35个循环后取1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的2 kb条带。

注意事项

1. 用70%的乙醇(自备)预先清洗组织分离过程中所使用的所有工具；
2. Proteinase K灭活步骤(95°C, 5 min)必须进行，否则其残留活性会抑制后续PCR反应；
3. PCR反应体系配制过程应于冰水浴中进行，以提高扩增特异性。

实验步骤

◇ DNA提取

推荐组织使用量：

- 1 - 3 mm小鼠尾尖；
- 2 - 5 mm²小鼠耳朵；
- 1 - 2个小鼠脚趾。

1. 根据需要裂解的样品数量，配制适量1 × 裂解液，单个样品所需裂解液配制方法如下：

1 × 裂解液(单样品)	
Proteinase K	4 μl
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	200 μl

▲ 应使用新鲜配制的1 × 裂解液；各组分添加完成后请涡旋振荡，充分混匀后再使用。

2. 取200 μl 1 × 裂解液加入到所需裂解的组织中，涡旋振荡后在55℃水浴中孵育20 min。对于常规大小目标片段，20 min孵育已足以释放足量的DNA模板。孵育时间也可根据实际情况进行调整，下表为不同长度的扩增片段在55℃下所推荐的孵育时间：

▲ 为保证DNA释放效率，请务必将组织全部浸没至裂解液中。孵育结束后组织块可能并未消化完全，属正常情况，不影响使用。

扩增片段长度	55℃推荐孵育时间
~ 500 bp	10 min
~ 1000 bp	20 min
~ 1500 bp	30 min

3. 孵育完成后，将样品置于95℃或者沸水浴中加热5 min灭活Proteinase K。

4. 将裂解产物涡旋振荡充分混匀后，12,000 rpm离心5 min，取上清即可进行PCR反应。也可将上清转移至另一个灭菌EP管中，-20℃可存放至少三个月。

◇ PCR扩增

1. 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)解冻完全后，上下颠倒混匀。于冰上配制如下反应体系：

ddH ₂ O	to 50 μl
2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus) ^a	25 μl
裂解产物 ^b	2 - 5 μl
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl

a. 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus) 中预混有终浓度1.5 mM的Mg²⁺。在实际使用时，可使用试剂盒提供的25 mM MgCl₂进行调整，调整间隔为每次增加0.5 mM。

b. 裂解产物加入量不应超过PCR反应总体积的1/10。

2. 推荐PCR反应条件设置：

94℃	5 min (预变性)	} 35 cycles
94℃	30 sec	
55℃*	30 sec	
72℃	30 sec/kb	
72℃	7 min (彻底延伸)	

* 退火温度需要根据引物Tm值进行调整，一般设置为低于引物Tm值1 ~ 2℃即可。

3. 扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测，无需添加DNA Loading Buffer。

常见问题与解决方案

◇ 扩增产量低或者无法扩增

- ① 组织中的一些PCR抑制物混入裂解液中：可尝试将裂解产物稀释10倍后再进行PCR扩增；
- ② DNA释放效率较差：可尝试延长55℃孵育时间至3 h；
- ③ Proteinase K没有充分灭活：灭活步骤在沸水浴中进行；
- ④ PCR循环数不够：一般而言，30 - 35个循环已经足以扩增足量的产物。然而对于某些片段，提高循环数可以获得更好的扩增效果；
- ⑤ 扩增反应退火温度设置太高：降低退火温度(每次降低3℃)；
- ⑥ PCR引物错误：设置以纯化过的小鼠基因组为模板的阳性对照反应。

◇ 非特异性产物很多

- ① PCR反应体系在室温下配制：在冰水浴中配制反应体系可显著降低非特异性扩增；
- ② 扩增反应退火温度设置太低：提高退火温度(每次提高2℃)；
- ③ PCR引物错配严重：重新设计引物。

◇ 阴性对照也出现扩增

PCR反应体系出现污染：逐个更换组织裂解体系、PCR扩增体系中的每一个组分。



ISO 9001: 2015