

Blood Direct PCR Kit (With Dye) 血液直扩 PCR 试剂盒（含染料）

产品简介

本品是一款可直接对全血样本进行 PCR 扩增而无需进行 DNA 纯化或样本预处理的试剂盒，兼容含 EDTA、肝素、柠檬酸盐等常规抗凝剂的新鲜血液、冷藏（冻）血液及 Whatman903®和 FTA®商用干血渍。试剂盒中含有经过基因工程改造的 DNA Polymerase 组合，具有保真性高、对 PCR 抑制剂耐受性强的特点，2× Blood Direct PCR Buffer 中添加强力延伸因子、扩增增强因子以及优化的缓冲体系，能够在快速延伸条件下高效扩增 8 kb 的基因组片段，对于 2 kb 以下的片段，设置 3-5 sec/kb 延伸时间即可完成扩增，从而大幅缩短血液样本的鉴定及检测时间。

本试剂盒的扩增产物的 3' 端为平末端，适用于一步法快速克隆及 TOPO 克隆试剂盒（Arcegen CAT# N132081）。试剂盒中提供的引物预混液 Positive control primer mix (10 μM each) 能够从哺乳动物和大多数脊椎动物的 sox21 基因上游保守序列中扩增出长度 237 bp 的片段，可作为阳性对照使用。

产品规格

产品货号	N132022E	N132022S
产品规格	50 T	100 T

组分信息

组分编号	组分名称	N132022E (50 T)	N132022S (100 T)
N132022-A	2× Blood Direct PCR Buffer	1.25 mL	2.5 mL
N132022-B	Advanced High-Fidelity DNA Polymerase Mix	50 μL	100 μL
N132022-C	Positive control primer mix (10 μM each)	100 μL	200 μL
N132022-D	10× DNA loading buffer	500 μL	1 mL

产品储存

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

适用范围

不同类型的全血样本直接 PCR 反应。

操作注意

- 1) 推荐血液模板使用量为反应总体积的 10%，即 50 μL 反应体系中加入 5 μL 全血作为模板，注意避免吸取血液凝块。

- 2) 延伸时间 10 sec/kb 可扩增 8 kb 以下大部分目的片段，3-5 sec/kb 即可扩增大部分 2 kb 以下片段。若扩增效率较低，可适当延长时间至 30 sec/kb。
- 3) PCR 反应结束后，推荐将反应产物于 4000 rpm (1000× g) 离心 1-3 min 以沉淀血细胞碎片，取上清进行下游分析。
- 4) 本产品不可直接用于医疗诊断。
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

操作说明

PCR 反应体系

表 1. PCR 反应体系

组分	体积 (μL)
2×Blood Advanced PCR Buffer	25 μL
Advanced High-Fidelity DNA Polymerase Mix	1 μL
Forward Primer (10 μM) ^b	2 μL
Reverse Primer (10 μM) ^b	2 μL
血液样本 ^c	X
ddH ₂ O	to 50 μL

【注】：各组分使用前应充分混匀。

- a. 使用前请充分混匀各组分。
- b. 推荐每条引物的使用终浓度为 0.4 μM，过高会导致非特异性扩增。
- c. 最佳全血模板浓度范围为 0.5%-20%，推荐使用量为 10%作为初始尝试条件，即 50 μL 反应体系中加入 5 μL 全血作为模板，注意避免吸取血液凝块。对于贮存在 Whatman®滤纸卡上的干血渍，则可取约 1 mm²带血渍的圆纸片，无需进行预处理，直接放入 PCR 反应液中即可进行扩增。

PCR 反应条件

表 2 PCR 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	30-35
退火*	60°C	15 sec	
延伸**	72°C	3-10 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

【Note】：

- 1) *退火温度为通用 T_m 值或低于引物 T_m 值 1-2°C。如果扩增产物特异性较差，可以建立退火温度梯度以寻找最佳退火条件。
- 2) **延伸时间 10 sec/kb 可扩增 8 kb 以下大部分目的片段，3-5 sec/kb 即可扩增大部分 2 kb 以下片段。若扩增效率较低，可适当延长时间至 20-30 sec/kb，不应超过 60 sec/kb。

PCR 产物分析

PCR 反应结束后，推荐将反应产物于 4000 rpm (1000× g) 离心 1–3 min 以沉淀血细胞碎片，取上清进行下游分析。该步骤可消除全血中多种残留成分对电泳检测的干扰，对使用高浓度血液作为模板的 PCR 产物尤为必要。通常，5 μL/50 μL (10%) 反应产物可取 30–35 μL 上清，3 μL/50 μL (5%) 反应产物可取 40–45 μL 上清。若需对 PCR 产物进行其它分析，例如酶切等，应将产物稀释 2–4 倍以降低反应中的盐及其它抑制剂对反应的干扰。

对照反应

试剂盒内提供引物预混液 Positive Control Primer Mix (10 μM each) 用于阳性对照反应。可从哺乳动物及其他许多脊椎动物的基因组 sox 21 基因上游序列中扩增出 237 bp 的片段，该扩增区是一段高度保守的非编码区。

Primer F: 5'- AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG -3'

Primer R: 5'- GCACTCCAGAGGACAGCGTGTCAATA -3'

常见问题与解决方案

无扩增产物或产量少	产物呈现高分子量弥散条带	产物呈现低分子量弥散条带
检查引物设计，确认引物浓度和纯度	提高退火温度或设置退火梯度	电泳前离心取上清
重复实验，确认体系、程序无误	延伸时间不应过长	提高退火温度或设置退火梯度
增加循环数	尝试不同的血液用量	尝试不同的血液用量
优化退火温度	减少循环数	减少循环数
尝试不同的血液用量	降低引物浓度	降低引物浓度
重新设计引物		重新设计引物