

Mouse Tissue Direct PCR Kit Plus

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Mouse Tissue Direct PCR Kit Plus	10189ES20	20 T
	10189ES50	50 T
	10189ES70	200 T
	10189ES76	500 T

产品描述

本试剂盒可直接快速地对小鼠组织（如鼠尾、鼠耳、鼠趾等）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。裂解产物可以直接加入到 PCR 反应体系中，无需精提纯化，操作方便。此外，本试剂盒对样品投入量要求低，2-5 mm² 鼠耳或肝脏、1-5 mm 鼠尾、1-2 个脚趾均可进行实验。

本试剂盒提供的 2× Hieff® Tissue 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。

该试剂盒可用于转基因鉴定、小鼠基因分型等。

产品组分

编号	组分	产品编号/规格			
		10189ES20 (20 T)	10189ES50 (50 T)	10189ES70 (200 T)	10189ES76 (500 T)
10189-A	Lysis solution ^a	5 mL	12 mL	4× 12 mL	10× 12 mL
10189-B	Proteinase K (20 mg/ml)	250 μL	625 μL	2× 1.25 mL	5× 1.25 mL
10189-C	2× Hieff® Tissue Direct PCR Mix ^b	500 μL	1.25 mL	5× 1 mL	10× 1.25 mL

a) Lysis solution 为裂解液，请戴手套操作。

b) 2× Hieff® Tissue Direct PCR Mix: 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、4 mM Mg²⁺、PCR 反应增强剂、稳定剂等。

运输方法

干冰运输。

保存方法

1. 组分 A: 2-8°C 保存，有效期 1 年。若长时间多次使用，请分装后储存，避免交叉污染。
2. 组分 B/C: -20°C 保存，避免反复冻融。有效期 1 年。

操作方法

样品基因组 DNA 释放

1. 剪取 2-5 mm² 鼠耳或肝脏组织，或 1-5 mm 鼠尾、或 1-2 个脚趾，置于 1.5 mL 离心管中；
2. 在上述离心管中加入 200 μL Lysis solution 和 10 μL Proteinase K，轻轻涡旋混匀，使得样品完全被浸润，短暂离心；
3. 在恒温孵育仪中 70°C 孵育 10 min；
4. 孵育完成后，将样品置于 95°C 或者沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K；
5. 将裂解产物涡旋振荡充分混匀后，12000 rpm (13400× g) 离心 10 min；

6. 将上清转移至新的离心管，-20℃保存不超过 48 小时或直接取上清用于后续 PCR 扩增。

【注】: 1. 组织应尽量剪碎，以便裂解反应更顺利进行。

2. 70℃孵育，一般 10 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 20-30 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 反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Hieff® Tissue Direct PCR Mix	25	1×
Forward Primer (10 μM)	2	0.4 μM
Reverse Primer (10 μM)	2	0.4 μM
裂解产物	1-5	-
ddH ₂ O	补足至 50 μL	-

【注】: 各组分使用前应充分混匀。

- 模板使用量:** 50 μL 体系建议初步采用 2 μL 上清液作为模板起始投入量，若产物量较少，可适当增加模板投入量；
- 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 50 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 反应程序

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

【注】: a) **退火温度:** 请参考引物的理论 T_m 值，退火温度可设置低于引物理论值 2-5℃。

- 延伸时间:** 1-4 kb 用 3-10 s/kb，4 kb 以上用 20 s/kb。
- 扩增循环数:** 35 个循环已可以扩增足量产物。
- 电泳上样:** 取 5-7 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（小鼠基因组 DNA）和阴性（通常为生理盐水）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% 次氯酸钠溶液或 75% 酒精中，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 6 kb 以内，以便扩增效率最佳。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
- 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× Mouse Direct PCR Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃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 4℃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。
非特异性扩增	PCR 循环数不足。	增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。
	PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高。	增加 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。
阴性对照出现目的条带	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。
	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。