

产品组分

组分名称	组分编号	规格 1	规格 2
		100 RXN(25 µL/RXN)	500 RXN(25 µL/RXN)
Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping	RM20397	1.25 mL	
Tissue Lysis Buffer II*	RM20831	20 mL	100 RXN × 5

*注: 裂解试剂包含蛋白酶 K, 4 周以内, 可存放于 4°C/室温, 若超过 4 周存放, 建议放置于 -20°C 冰箱。

产品说明

本试剂盒包含整套的组织裂解液和 PCR 扩增体系, 适用于小鼠基因型快速鉴定 (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, 极大缩短了实验耗时。使用时, 将组织浸泡在裂解液中, 55°C 孵育 15 min 后, 95°C 加热 5 min 灭活蛋白酶 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 4 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, 超过 4 Kb 以上的片段需要进行优化条件。

试剂盒中组织裂解液已经包含了蛋白酶 K, 不需要额外配制, 性能稳定, 放置于室温或 4°C 保存 4 周, 对裂解性能无影响, 可有效避免了组织裂解液的反复冻融。

试剂盒中配有 Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping, 包含高性能的 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。Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。体系中包含了 DNA Loading 染料, 可在反应结束后直接进行电泳, 使用方便快捷。

保存温度

-20°C

操作说明

标准操作

- 取干净的 1.5 mL EP 管, 向 EP 管中加入鼠尾 (鼠尾、鼠趾推荐 1-2 mm 或 3-5 mg, 鼠耳推荐 1-5 mm² 或 3-5 mg)。
- 向 EP 管中加入 200 µL Tissue Lysis Buffer II, 完全淹没组织。

注: Tissue Lysis Buffer II 使用前, 需放置至澄清状态。

- 推荐裂解反应如下:

步骤	温度	时间
裂解	55°C	15 min
灭活	95°C	5 min

注: 组织裂解时, 务必将组织完全浸没于组织裂解液中。裂解完成后, 组织外观上仍然完整, 但足量的基因组 DNA 已经释放, 不影响后续的 PCR 实验。

- 裂解后进行 12,000 rpm, 离心 2 min, 取上清进行 PCR 反应。上清可在 -20°C 保存至少三个月。

注: 上清 -20°C 冻存后再使用, 需注意在使用前放置至澄清状态。

推荐的反应体系如下:

组份	25 µL	终浓度
Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping*	12.5 µL	1X
上游引物(10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
下游引物(10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
裂解产物	1-2 µL	/
Nuclease-free Water	to 25 µL	N/A

*注: 试剂 Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping 中含有 DNA Loading 染料, PCR 产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳, 不用另外添加 Loading buffer。

推荐的 PCR 反应程序如下：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	} 30-35
退火	55-65°C	20-30 s	
延伸	72°C	30-60 s/kb*	
终延伸	72°C	1-5 min	1
Hold	4-12°C	-	1

*，注：4 kb 以下片段，按照 30 s/kb 扩增，4 Kb 以上片段，按照 60 s/kb 扩增。

常见问题及对策

1. 扩增产量低或者无法扩增：

- a. 裂解不充分，建议 55°C 裂解时间延长至 3 h；
- b. 抑制剂作用：可尝试稀释样本 2 倍-5 倍后进行扩增；
- c. 蛋白酶 K 没有被充分灭活：可以延长灭活时间为 30 min；
- d. 扩增片段较长：扩增速度设置为 1 kb/1 min，同时延长终延伸时间至 10 min 或采取两步法扩增长片段。
- e. PCR 引物问题：设置阳性对照反应。

2. 存在非特异性扩增条带：

- a. 配制 PCR 体系时环境温度过高：冰上配制反应体系，配完尽快开始 PCR 反应；
- b. PCR 体系中引物浓度或 DNA 模板浓度过高：适当降低引物和模板用量；
- c. 退火温度过低或循环数太高：提高退火温度，或降低循环数，可以进行梯度优化实验；
- d. PCR 引物错配：重新设计 PCR 引物。