

Animal Tissue Direct PCR Kit(With Dye)

动物组织直接 PCR 试剂盒

产品简介

动物组织直接 PCR 试剂盒是一款可直接对不同动物组织进行 PCR 扩增的试剂盒，适应性广、稳定性强、操作简易。本试剂盒采用独特的裂解缓冲液体系，可以快速的裂解多种动物组织样品并释放出基因组 DNA，如昆虫足翅、鼠尾、鼠趾、动物皮肤和内脏等。裂解产物可以用于 DNA 提取纯化、也可以直接用于 PCR 反应、也可以在 -20°C 或以下温度条件下长期保存备用。

本试剂盒中提供的 2×Tissue Direct PCR Mix (With Dye) 具有很强的扩增兼容性，不需要额外采用纯化提取试剂去除裂解产物中的各种残骸杂质，能直接以待测样品裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂为 2 倍浓缩 PCR 反应混合液，包含了用于 PCR 扩增除模板和引物外的所有组分，大大简化扩增步骤的操作过程，降低污染机率。

该试剂盒可用于动物基因扩增检测、转基因动物基因型鉴定等。

产品信息

货号	10184ES50 / 10184ES70
规格	50 T / 200 T

组分信息

组分编号	组分名称	10184ES50	10184ES70	储存条件
10184-A	Lysis Buffer	10 mL	4×10 mL	2-8°C
10184-B	Proteases	100 μL	400 μL	-25~-15°C
10184-C	2×Tissue Direct PCR Mix (With Dye)	500 μL	1×2 mL	-25~-15°C
10184-D	5×PCR Enhancer	200 μL	800 μL	-25~-15°C

a) Lysis Buffer 和 Proteases 两种组分配合使用于动物组织裂解。

b) 2×Tissue Direct PCR Mix (With Dye) 包含 PCR 扩增所需要的热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 Mg²⁺ 等；已混有溴酚蓝染料作为电泳指示剂，PCR 产物可以直接进行电泳。

c) 5×PCR Enhancer: 高 GC 含量扩增（如大于 65%）时，建议使用 5×PCR Enhancer。

储存条件

- 试剂 10184-A 【Lysis Buffer】为动物组织裂解缓冲液，建议保存于 2-8°C。
- 试剂 10184-B 【Proteases】为动物组织裂解剂，使用时请勿长久开盖，建议保存于 -25~-15°C，避免反复冻融。
- 试剂 10184-C 【2×Tissue Direct PCR Mix (With Dye)】，建议保存于 -25~-15°C，避免反复冻融。
- 试剂 10184-D 【5×PCR Enhancer】，建议保存于 -25~-15°C，避免反复冻融。

试剂盒有效期 1 年。

使用说明

- 在离心管中加入 200 μL Lysis Buffer 和 2 μL Proteases，轻轻涡旋混匀。
- 取约 10 mg（长度 2 mm 左右）动物组织，置于上述离心管中，轻轻涡旋混匀。

3. 55°C 孵育 5-30 min, 然后 95°C 处理 5 min。
4. 12,000 rpm 离心 2 min。
5. 将上清转移至新的离心管, -20°C 保存或直接用于 PCR 扩增。

【注】

- a) Lysis Buffer 与 Proteases 混合后尽快使用, 不宜长期保存; 大量样本操作时, 可以将 Lysis Buffer 与 Proteases 按 100 μL:1 μL 的比例混匀备用。
- b) 组织应取少量并尽量剪碎, 以便裂解反应更顺利进行。各组织推荐用量: 鼠尾: 长度 2-4 mm; 鼠趾: 1-4 个; 鼠脏器、脑: 直径 2-4 mm; 斑马鱼、线虫、果蝇等昆虫组织: 1-4 个; 细胞数量: 10^5 - 10^8 个。斑马鱼、线虫、果蝇等较小样本的组织, 可适当减少 Lysis Buffer 至 50-100 μL。昆虫等外壳坚硬的样本, 建议剪碎样本并增加 Proteases 至 4 μL。
- c) 55°C 孵育, 一般 5 min 即可满足多数 PCR 需求, 如鼠尾、鼠耳等组织; 若需要的 DNA 量较大或样品较难裂解, 可将时间延长至 30 min 或更久; 裂解时间可在 5-30 min 之间调整, 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。

6. 推荐 PCR 反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
2×Tissue Direct PCR Mix (With Dye)	10	1×
Forward Primer (10 μM)	0.5	0.25 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.5	0.25 μM
裂解产物 (DNA 模板)	2	-
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。

- a) 模板用量: 建议总体系的 5-20% 之间, 避免超过总体系的 20%。
- b) 引物终浓度: 反应性能较差时, 推荐在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度。
- c) 反应体系: 推荐使用 20 μL, 以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- d) 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。
- e) 对照反应: 建议进行 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。

7. 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	20 sec	
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 5°C, 或通过梯度 PCR 确定最佳温度。

注意事项

1. 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。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 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 5-20%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。