



Mouse Tail Direct PCR Kit

Mouse Tail Direct PCR Kit

Mouse Tail Direct PCR Kit(UNG)

For animal tissue direct PCR using ≤ 10 mg tissue

For performing PCR directly from Mouse tissue without prior DNA purification.

Research use only.



目 录

产品介绍	3
产品特点	4
试剂盒应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
试剂盒组分信息	5
储存条件	6
注意事项	7
操作前准备事项	8
实验材料和设备	8
安全性	8
操作指南	9
● 鼠尾直接 PCR 操作步骤	9
PCR 对照反应	11
操作示意图	12
问题分析指南	13

产品介绍

本产品采用独特的裂解缓冲液体系可以快速的从小鼠鼠尾、鼠耳、肌肉等组织样本中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65°C 条件下 10-30 min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 等的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

2x M-PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Foregene D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

2x M-PCR Easy™ Mix(UNG)在 2x PCR Mix 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶(Uracil-N-glycosylase)。在 PCR 反应前，利用 UNG 酶降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，UNG 酶对不含有尿嘧啶的模板不会造成任何影响，从而保证扩增的特异性和准确性，防止了大规模基因检测时可能出现的 PCR 产物污染问题。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量小，少到 5mg 小鼠组织或 2-5mm 鼠尾即可进行实验。
- ◆ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ◆ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。
- ◆ 防污染 PCR 体系 **2x PCR Mix(UNG)**，有效消除由 PCR 产物所引起的污染，保证扩增的特异性和准确性。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：小鼠鼠尾、鼠耳、肌肉等组织。
- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因型鉴定、动物基因分型等。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的鼠尾直接 PCR 系列试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Mouse Tail Direct PCR Kit					
鼠尾直接 PCR 试剂盒					
试剂盒组成		TP-0133T	TP-01331	TP-01332	TP-01333
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer MP	5ml	20ml	50ml	100mlx2
	Foregene Protease Plus	220µl	880µl	1.1mlx2	8.8ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x M1-PCR Easy™ Mix	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Mouse Tail Direct PCR Kit -UNG					
鼠尾直接 PCR 试剂盒-UNG					
试剂盒组成		TP-0134T	TP-01341	TP-01342	TP-01343
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer MP	5ml	20ml	50ml	100mlx2
	Foregene Protease Plus	220µl	880µl	1.1mlx2	8.8ml
	6x DNA Loading Buffer	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5mlx4
Part II	2x M1-PCR Easy™ Mix(UNG)	500µl	1mlx2	1.7mlx3	1.7mlx12
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer MP: 提供小鼠组织裂解反应所需的环境。
- ◆ Foregene Protease Plus: 在裂解缓冲液的环境下, 裂解鼠尾或小鼠组织, 释放基因组 DNA。
- ◆ 2x M1-PCR Easy™ Mix: 包括福际生物特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时, 只需将适当的裂解混合液、引物、ddH₂O 添加到 2x M1-PCR Easy™ Mix 中即可用于 PCR 反应。

- ◆ **2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)**: 在 2× M1-PCR Easy™ Mix 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶，从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。
- ◆ **6× DNA Loading Buffer (附赠)**: 该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在进行琼脂糖凝胶电泳时，配搭使用试剂盒附赠的 6× DNA Loading Buffer，以便取得好的电泳结果。切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中有一大团拖尾亮光，影响实验结果。

储存条件

1. 运输条件

- ◆ 全程低温冰盒运输，保证试剂盒 Part I、Part II 处于 < 4°C 状态。

2. 保存条件

- ◆ 本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C。
 - ❖ 试剂 Buffer MP, 在干燥条件下, 可保存 12 个月; 如需保存更长时间可置于 2-8°C

注意: 若低温保存, 溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟, 以溶解沉淀, 混匀后再使用。

 - ❖ 试剂 Foregene Protease Plus, 具有独特配方, 为保证其更好的活性和稳定性, 请保存于 4°C。
 - ❖ 试剂 6× DNA Loading Buffer, 可置于 4°C 或 -20°C 长期保存。
- ◆ 本试剂盒 Part II 保存在 -20°C。
 - ❖ 试剂为相应的 2× M1-PCR Mix, 若频繁使用, 也可置于 4°C 短期保存 (限 10 天内用完)。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ◆ 请尽量使用新近采取的小鼠组织样本进行实验，若组织样本存储较长时间，请避免样本反复冻融。
- ◆ 若 Buffer MP 有沉淀析出，可放置于 37°C 待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ◆ Foregene Protease Plus 具有独特配方，请置于 4°C 存储，切勿置于 -20°C。
- ◆ 2x M1-PCR Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 电泳检测时，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中出现一大团拖尾亮带，影响实验结果。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。鼠尾直接 PCR 系列试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 鼠尾、鼠耳或其他组织（新鲜的、冷冻保存的）。
- ◆ 1.5ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机($\geq 13,400\times g$)、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Foregene Protease Plus: 增敏剂，刺激性。

操作指南

预防样本间交叉污染

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的取样器材。

鼠尾直接 PCR 操作步骤

A. 样本 DNA 释放

1. 在离心管中加入 100 μ l Buffer MP， 4 μ l Foregene Protease Plus，轻微涡旋混匀。
注意： Buffer MP 与 Foregene Protease 混合后不宜长期保存，配制后请尽快使用。
2. 剪取 2-5mm 鼠尾或 5-10mg 组织放入上述离心管中，轻微涡旋混匀。
3. 65 $^{\circ}$ C 孵育 10-30min，然后 95 $^{\circ}$ C 处理 5min。
注意： 65 $^{\circ}$ C 孵育，一般只需 10min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难酶解，可以将时间延长至 30min。组织块不需完全酶解，残余的部分在后续离心步骤中可被除去。
4. 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 5min。
5. 转移上清至新的离心管，4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

B. PCR 反应鉴定

1. 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到 2 \times M1-PCR EasyTM Mix 或 2 \times M1-PCR EasyTM Mix(UNG)，再添加相应的引物，并用 ddH₂O 使其稀释为 1 \times （PCR 体系配制见下表 1）。
注意：用于后续 PCR 检测时，模板量占 PCR 体系的 5-20% 之间最佳，不能超过 25%。如 50 μ l 的 PCR 体系中，加入 2.5-10 μ l 裂解液即可，但不能超过 12.5 μ l。
2. 根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应(2 \times M1-PCR EasyTM Mix 反应条件见下表 2-1、2 \times M1-PCR EasyTM Mix(UNG) 反应条件见下表 2-2)。
注意：尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。
3. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

注意：建议使用随试剂盒配送的 6× DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 1：PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× PCR Mix ^{1*}	10μl	25μl	1×
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM ^{2*}
裂解混合液(DNA模板)	4μl	10μl	
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	5μl	13μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：根据试剂盒的不同，2× PCR Mix 分别为：2× M1-PCR Easy™ Mix 或 2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)。

2*：通常引物终浓度为0.2-0.25μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5μM范围内调整引物浓度。

注意：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。

表 2-1：2× M1-PCR Easy™ Mix PCR 反应条件举例

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94°C	3min	1	预变性
2	94°C	10sec	30-40	变性
3	50-65°C	20sec		引物退火
4	72°C	x min (2kb/min) ^{1*}		延伸
5	72°C	5min	1	终延伸

注意：PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

表 2-2：2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG) PCR 反应条件举例

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	5min	1	UNG酶处理
2	94°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	50-65°C	20sec		引物退火
5	72°C	x min (2kb/min) ^{1*}		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

1*：1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30sec。

注意：此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

PCR 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，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行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。

A：阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2x PCR Mix有效性。其反应体系的配制见下表3。

表 3：对照 PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2x PCR Mix ^{1*}	10μl	25ul	1x
Forward Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) ^{2*}	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板 ^{3*}	xμl	xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-x)μl	(23-x)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：根据试剂盒的不同，2x PCR Mix分别为：**2x M1-PCR Easy™ Mix**或**2x M1-PCR Easy™ Mix(UNG)**。

2*：引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因、基因组上的保守序列等（请确保这些引物的可用性）。

3*：可选用样本纯化的DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B：阴性对照

PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染或实验是否有其他污染源。

操作示意图



2-5mm鼠尾或5-10mg组织



裂解 { 100µl Buffer MP : 提供酶解环境
4µl Foregene Protease Plus : 酶解组织 } 65°C ; 10-30min



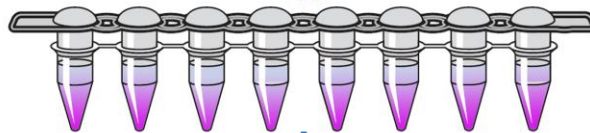
失活 : 95°C ; 5min



离心 : 13,400×g ; 2min.
上清转移至新的离心管中待用。

Sample lysate

Specific Primers
DNase-Free ddH₂O } 2× M1-PCR Easy™ Mix
Or
2× M1-PCR Easy™ Mix(UNG)



PCR 反应体系

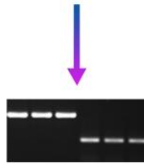
组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× M1-PCR Easy™ Mix	10µl
Specific Primers	1µl
Sample lysate	2µl
DNase-Free ddH ₂ O	7µl

PCR 反应条件

Step	Temp	Time	Cycles
1	94°C	3min	1
2	94°C	10sec	} 35-40
3	50-65°C	20sec	
4	72°C	xmin(2kb/min)	
5	72°C	5min	1



PCR扩增



琼脂糖凝胶电泳检测结果

PCR 反应体系(UNG)

组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× M1-PCR Easy™ Mix (UNG)	10µl
Specific Primers	1µl
Sample lysate	2µl
DNase-Free ddH ₂ O	7µl

PCR 反应条件(UNG)

Step	Temp	Time	Cycles
1	50°C	5min	1
2	94°C	5min	1
3	94°C	10sec	} 35-40
4	50-65°C	20sec	
5	72°C	xmin(2kb/min)	
6	72°C	5min	1

问题分析指南

以下针对鼠尾直接 PCR 系列试剂盒在鼠尾或组织直接 PCR 实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的使用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就分别对使用鼠尾直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

正对照、待测样本均无条带

1. PCR 反应体系或反应条件不合适。

建议：使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2x PCR Mix 应保存于-20°C，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4°C 短时间存放。

3. 引物设计问题。

建议：尝试重新设计引物进行检查。

正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱

1. PCR 条件没有使用正确。

建议：请仔细确认 2x PCR Mix 的类型，对应相应的 PCR 条件进行 PCR 扩增。

2. 加入组织裂解液过量。

建议：增大反应体系，或减少裂解液的用量。

3. 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。

建议：裂解混合液可在 4°C 保存 2-3 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。

4. 模板加入量不适合。

建议：在反应体系 10-20% 范围内优化模板加入量。反应效性能较差时，可以降低模板浓度调节到低于 10% 的范围。

5. PCR 循环数不足。

建议：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

1. 退火温度偏低。

建议：适当提高退火温度。或对退火温度做一个梯度摸索。

2. PCR 循环数过多。

建议：适当降低循环次数，推荐在 **35-40** 循环为佳。

3. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为 **0.2 μ M** 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 **0.1-0.5 μ M** 范围内调整引物浓度。

4. 模板加入量过多。

建议：将模板加入量控制在 **10-20%**。反应效性能较差时，可以降低模板浓度调节到低于 **10%** 的范围。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：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。

2. 样本间交叉污染。

建议：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。

3. PCR 产物污染。

建议：如果实验室检测同类型样本多，最好使用 **UNG** 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

