

产品简介

Blood direct PCR Kit可以直接对全血样本进行PCR，无需进行DNA纯化或样品预处理。可用于直接扩增的血样类型包括：新鲜血液、4℃贮存血液、冷冻血液以及储存在Whatman903®和FTA®商用卡上的干血渍，且兼容所有常规抗凝剂(EDTA、柠檬酸盐、肝素等)。试剂盒中包含Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase，是在Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase基础上经过工程学改造而成的。该酶对全血样品中的PCR抑制剂具有超强的抵抗力，可扩增全血浓度高达40%。配以精心优化的2 × Phanta Blood Buffer V2，Blood Direct PCR Kit V2能够从全血样品中高效扩增长达10 kb的基因组片段。Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase扩增产物为平端，适用于ClonExpress®快速克隆试剂盒(C112/C113)。试剂盒配有与哺乳动物和其他许多脊椎动物兼容的引物预混液Positive control primer mix，可用于进行阳性对照反应。

产品组成

组 分	PD103-01 50 rxn (50 µl/rxn)	PD103-02 200 rxn (50 µl/rxn)
Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/µl)	75 µl	300 µl
2 × Phanta Blood Buffer V2	1.25 ml	1.25 ml × 4
Positive control primer mix (10 µM each)	50 µl	50 µl
10 mM each dNTPs	50 µl	200 µl
10 × Loading buffer	1.25 ml	1.25 ml

储存条件

-20℃保存。

质量控制

50 µl PCR体系中加入1.5 U本酶，以5 µl全血为模板扩增7.5 kb片段。35个循环后将1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的7.5 kb条带。

注意事项

- 推荐血液模板使用量为反应总体积的1/10，即50 µl的反应体系内加入5 µl全血。
- 吸取抗凝血，尤其是长期存放过的抗凝血时，应尽量避免吸取血液凝块。
- 使用全血做为扩增模板，Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase推荐使用量为1.5 U/50 µl。提高酶的使用量有助于扩增产量的提高，但请勿超过2 U/50 µl。
- 延伸时间按30 sec/kb设定，如不足15 sec，设置15 sec即可。超过5 kb片段扩展时，如发现扩增效率较低，可适当延长延伸时间至60 sec/kb。
- PCR完成后，推荐将反应液于1,000 × g (大约4,000 rpm) 离心1~3 min以沉淀血细胞碎片，之后取上清进行下游分析。

使用方法

1. 反应体系配制:

所有组分解冻后请先充分摇匀，使用完毕后及时放回-20℃。2 × Phanta Blood Buffer V2请勿长时间敞口放置。

ddH ₂ O	13.5 µl
2 × Phanta Blood Buffer V2 ^a	25 µl
10 mM each dNTPs	1 µl
引物1 (10 µM) ^b	2 µl
引物2 (10 µM) ^b	2 µl
全血 ^c	5 µl
Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/µl) ^d	1.5 µl

使用移液枪上下吹打混匀

- 包含终浓度2 mM Mg²⁺。
- 推荐每条引物使用终浓度为0.4 µM，引物使用量太多会导致非特异性扩增增加。
- 最适全血模板浓度范围为1%~20%，推荐使用10%作为初始尝试条件，尽量避免吸取血液凝块。如果样本是贮存在Whatman滤纸卡上的干血渍，则可取约1mm²带血渍的圆纸片，将其直接放入PCR反应液中，无需预处理。
注1: Blood Direct PCR Kit V2已经在许多哺乳动物物种上进行了成功测试。此外，使用该试剂盒也已成功扩增了几种鸟类全血。对于鸟类和血细胞中带细胞核的其他物种，可能需要减少用于PCR反应的血量。
注2: 全血若短期贮存 (少于3个月)，可置于4℃；若长期贮存，推荐存于-20℃或者Whatman FTA®/930®卡上。
- Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase是一种带有校对活性的高保真聚合酶，其保真度是普通Taq聚合酶的52倍。该酶中添加了可以在常温下封闭其外切酶和聚合酶活性的单克隆抗体，可进行高特异性的热启动PCR。当使用全血做为扩增模板时，推荐的酶的终浓度为1.5 U/50 µl反应。提高酶的使用量有助于扩增产量的提高，但请勿超过2 U/50 µl。
注1: Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase具有较强的校对活性，扩增产物为平末端。如扩增产物需要进行TA克隆，加A之前必须进行DNA纯化。

2. PCR反应条件设置:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	
退火 ^b	56°C~72°C	15 sec	35 ^d
延伸 ^c	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	1

a. 预变性 (95°C, 5min) 可以让白细胞裂解, 释放可用于PCR扩增的基因组DNA。请勿缩短时间或降低温度。

b. Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase能够促进模板和引物高效退火。一般来说, 退火温度设置为引物Tm值即可。然而, 使用高的退火温度可以有效减少非特异性扩增, 并提高全血模板的扩增效率。因此, 如扩增产物特异性较差, 可以建立一个温度梯度反应去寻找引物模板最适退火温度。推荐退火时间设置为15 sec即可。

c. 延伸时间按30 sec/kb设定, 如不足15 sec, 设置15 sec即可。超过5 kb片段扩展时, 如发现扩增效率较低, 可适当延长延伸时间至60 sec/kb。

d. 一般而言, 35个循环已可以扩增足量产物。太多的循环将会导致非特异性扩增增加, 且有可能降低扩增保真度。

3. 扩增产物分析:

PCR完成后, 建议将反应液于1000 × g (大约4000rpm) 离心1~3 min以沉淀血细胞碎片, 之后取上清进行下游分析。该步骤可有效去除多种血液组分。当使用高浓度血液模板时此步尤为重要, 因为经过PCR循环, 反应管中会存在大量的血细胞碎片。这些碎片会干扰下游的检测, 如琼脂糖电泳检测。若需对PCR产物进行酶切分析(PCR-RFLP), 应预先将其稀释2~4倍, 以去除存在于PCR反应液中的盐及其它抑制剂对酶切反应的干扰。

4. 对照反应:

试剂盒中提供引物预混液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中扩增237 bp的片段。该扩增区位于sox21基因的上游, 是一段高度保守的非编码区。

Primer #1 (24-mer) 5'-AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG-3'

Tm: 69.5°C (S=G or C), 使用Primer Premier 5 计算。

Primer #2 (27-mer) 5'-GCACTCCAGAGGACAGCRGTGCAATA-3'

Tm: 67.9°C (R=A), 71.5°C (R=G), 使用Primer Premier 5 计算。

反应体系

ddH ₂ O	15.5 μl
2 × Phanta Blood Buffer V2 ^a	25 μl
10 mM each dNTPs	1 μl
Positive control primer mix (10 μM each)	2 μl
全血	5 μl
Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	1.5 μl

使用移液枪上下吹打混匀

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	
退火	68°C	15 sec	35
延伸	72°C	15 sec	
彻底延伸	72°C	5 min	1



图1. 使用Positive control primer mix直接从不同物种的全血中扩增237 bp的DNA片段。所有血样均为4°C存储的肝素抗凝血, 血液模板使用浓度为10%。NTC, no template control; PC, positive control, 使用纯化过的人基因组DNA作为扩增模板。

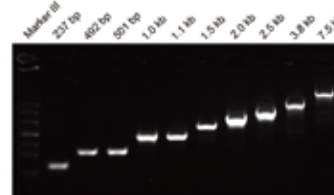


图2. 使用Blood Direct PCR Kit直接从人全血中扩增不同长度DNA片段。血样为4°C存储的肝素抗凝血, 血液模板使用浓度为10%。

5. 反应实例:

以人全血(4°C存储抗凝血)为模板, 分别扩增长度为237 bp、492 bp、501 bp、1.0 kb、1.1 kb、1.5 kb、2.0 kb、2.5 kb、3.8 kb、7.5 kb的目标片段。全血用量均为5 μl/50 μl reaction; Phanta Blood Super-Fidelity DNA Polymerase使用量为1.5 μl/50 μl reaction; 退火温度均为68°C; 延伸时间为30 sec/kb。(如不足15 sec, 设置15 sec即可)由图2可见, 所有片段均可高效扩增。

6. 常见问题与解决方案:

无扩增产物或者产物量很少

- 核对引物设计, 确认引物的纯度和浓度
- 重复实验, 确认反应体系配制、反应程序设置无误
- 增加循环数
- 提高Mg²⁺浓度
- 优化退火温度
- 尝试不同的血液用量

产物呈现高分子量弥散条带

- 扩增样品电泳检测前离心取上清
- 延伸时间不应超过60 sec/kb
- 优化退火温度
- 尝试不同的血液用量
- 减少总循环数
- 降低引物浓度

产物呈现低分子量分散带

- 扩增样品电泳检测前离心取上清
- 提高退火温度
- 尝试不同的血液用量
- 降低引物浓度
- 减少总循环数
- 重新设计引物

全血扩增引物设计注意事项

1. 引物3'端最后一个碱基选择C或G;
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配;
3. 引物3'端尽量避免出现发夹结构;
4. 引物Tm值控制在60°C-72°C之间 (推荐使用软件Primer Premier 5进行计算);
5. 引物额外附加序列, 即与模板非配对序列, 不应参与引物Tm值计算;
6. 引物GC含量控制在40%-60%之间;
7. 正向引物和反向引物Tm值以及GC含量尽可能一致。