One Step U+ Probe Mouse Genotyping Kit

PD104-01

Version 6.1

Vazyme

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

本试剂盒包含整套动物组织DNA粗提取以及防污染探针法QPCR扩增体系，适用于小鼠基因型快速鉴定(Rapid 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，产物直接进行QPCR扩增，避免多次开盖移液等操作，基因型结果直接由软件分析得出，避免人工核对输入引入错误，并能极大缩短实验耗时。试剂中的dUTP/UDG防污染系统可在室温下将含U的污染物迅速降解，显著降低气溶胶污染并提高检测通量和结果的重现性。

产品组成

组　分	200 rxn
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	2 x 20 ml
Proteinase K	800 μl
2 × AceQ U+ Probe Master Mix[a]	2 x 1.25 ml
50 × ROX Reference Dye 1[b]	100 μl
50 × ROX Reference Dye 2[b]	100 μl

a. 包含AceTaq®DNA Polymerase,dNTP Mix,Mg^{2+}。

b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用ABI 7900HT/7300 Real-Time PCR System和StepOnePlus®时使用50 × ROX Reference Dye 1; ABI 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000P使用50 × ROX Reference Dye 2; Roche, Bio-Rad的Real Time PCR仪时不必使用ROX。

储存条件与保质期

1 x Mouse tissue Lysis Buffer 4℃保存；其余组分-20℃保存；使用过程中请尽量避免反复冻融。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。

应用范围

小鼠基因分型　小鼠转基因检测　小鼠基因敲除分析

实验操作及注意事项

1. 使用前请上下颠倒以混匀Mix，请勿vortex以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，进而影响定量结果。Mix经混匀后轻微离心即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎Mix起泡，需再次离心方可使用。
2. 本产品基于的AceTaq® DNA Polymerase是化学修饰的热启动酶，需设置预变性温度为95℃，时间为至少5分钟以充分释放酶活。如模板的GC含量较高，可将预变性的时间延长至10分钟。
3. 本产品的污染消化步骤可有效去除含U的PCR产物气溶胶对体系的干扰，如无需该步骤亦可省去，不影响后续PCR反应。

参考示例

1.DNA提取

推荐组织使用量:0.5-1mm小鼠尾尖/1-3mm^2小鼠耳朵/0.5个小鼠脚趾

1.1 根据需要裂解的样品数量适当放大个数后配制1× 裂解液，单个样品所需裂解液配制方法如右表：

1.2 在灭菌1.5 ml EP管中，添加200μl 1× 裂解液至所需裂解组织中，涡旋震荡后在55℃水浴中孵育10-20 min.为保证DNA释放效率，请务必将组织全部浸没至裂解液中。对于推荐的组织用量，20 min孵育已足以释放足量的DNA模板。

1.3 孵育完成后，将样品置于95℃或沸水浴中加热5 min灭活Proteinase K。

1.4 将裂解产物涡旋震荡充分混匀后，12000 rpm离心5 min，上清即可用于QPCR反应。也可将上清转移至另一个灭菌EP管中，-20度可存放至少三个月。

1× 裂解液（单样品）	
Proteinase K	4 μl
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	200 μl

注意：应使用新鲜配制的1×裂解液；各组分添加完成后请涡旋震荡，充分混匀后再使用。

2. **QPCR反应**

测试机型为QuantStudio™ Real-Time PCR 6。

1）qPCR反应体系配制

2 × Genotyping Probe Master Mix	10 μl
Primer 1F(10μM)	0.4 μl
Primer 1R(10μM)	0.4 μl
Primer 2F(10μM)	0.4 μl
Primer 2R(10μM)	0.4 μl
Taqman Probe 1(10μM)	0.2 μl
Taqman Probe 2(10μM)	0.2 μl
ROX Reference Dye 2	0.4 μl
模板DNA	x μl
灭菌蒸馏水	Up to 20 μl

注：反应体系中各成分的量可根据以下原则进行微调：

a. 引物终浓度可在0.1-1.0μM范围内调整。

b. 探针终浓度可以在50nM-250nM之间调整。

c. 扩增产物长度请尽量选择在80-200bp范围内。

d. 含有盐离子的模板体积不要超过反应体积的1/10。

2）按以下条件进行QPCR反应

污染消化	Reps:1	37°C	2 min
预变性	Reps:1	95°C	5-10 min
循环反应	Reps:40-45	95°C	10sec
		60°C	30sec

注意：

a. AceTaq®DNA Polymerase需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置PCR反应预变性条件为95°C 5分钟。如果模板的GC含量较高，可将预变性时间延长至10分钟。

b. 延伸时间请根据您使用的QPCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900HT时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒。

c. 反应结束后对结果进行分析，确认QPCR的等位基因检测散点图。可通过export直接输出相应加样孔的基因型用于粘贴记录。

常见问题与解决方案

1. 针对探针法QPCR的常见问题（见vazyme产品Q113说明书）

2. 针对双探针基因型鉴定实验的问题（软件分析相关问题基于Q6的Realtime PCR Software）

1.1 消化组织过大、消化时间过长对体系的影响

请参照说明书的推荐组织用量和消化时间进行组织的消化处理。一般推荐大小的组织消化20分钟可得到1-2ng/μl的DNA浓度。消化组织过大及消化时间过长会引起体系中杂质成分的大量增加，影响后续的QPCR反应，一般推荐大小的小鼠组织消化时间在10-20分钟能得到较好的扩增效果。小鼠组织重量超过0.01g、或适合大小的组织经过消化6小时以上的消化液将不再适合作为后续的QPCR反应检测模板。

1.2 消化组织过小、消化时间过短对体系的影响

用于消化组织过小（少于0.0005g）、或正常大小组织消化时间过短（少于5分钟）将可能无法释放足量的DNA作为模板用于后续扩增，擅自增加PCR体系中模板的体积以期增加模板量会带入不适合的盐离子，不推荐用于该快速探针法QPCR反应。

1.3 无模板样品的作用

是否设定无模板样品不会影响软件对结果分析的判断，建议在实验体系尚未完全成熟的条件下每次实验设定一个无模板样品，可有效判断体系污染、扩增特异性差等潜在问题，在成熟的检测体系中可以考虑舍去无模板样品的设定。

1.4 浓度差异导致的不识别

同一次定量分型实验中如果不同样品的DNA浓度差异过大（如个别点有超过3个及以上的Ct值差异），该点极有可能不能被系统正确判断。因此一个批次用于检测的DNA样品的浓度应尽量一致，即原始组织样品内容及大小一致、消化处理时间一致，可以得到基本一致的基因组浓度。需要将不同批次浓度可能有较大差异的模板在一个反应内时行的，应提前将模板按照预期可能存在的浓度差异进行稀释调整，以达到最佳的可分析效果。

1.5 两套引物扩增效率差异导致的不识别

针对两个基因型定制的两套引物可能存在潜在的互相影响，扩增效率的差异可能产生软件对于杂合子基因型的误判，设计引物时应考虑到这一影响因素，并在实验开展前先进行单引物/探针体系的扩增效率测定，使两个引物/探针体系有接近的扩增效率，对于杂合子来说扩增曲线应尽量重合。

1.6 在一次上机反应中鉴定不同基因的实验需要分别分析

在一个上机反应中完全可以完成针对不同目的基因的不同引物/探针体系的实验，结果不会互相干扰。但需要注意加样时区分不同目的基因的模板加样孔区域，分析时正确圈中所有同一目的基因的样品孔进行结果分析。

1.7 一组实验中不完全包括野生型、突变纯合和突变杂合导致分析结果错误

一组实验中不完全包括野生型、突变纯合和突变杂合三种完整的基因型搭配会导致软件不能判断（全部为unidentified）或错误判断样品的基因型（如在缺少野生型对照的条件下把杂合判断为野生），因此一次实验中必须包含全部三种基因型样品，如果不能预期是否全部包含，则应另外设定确定基因型的对照孔以保证软件对未知样品的正确判断。