

(核酸直接释放)

Nu-C0101

试剂盒应用

本试剂盒可用于动物组织或细胞 DNA 的克隆、重组细胞株鉴定、DNA 病毒鉴定、STR 鉴定等。依托 NuSmart®平台针对动物组织和细胞开发出 TC-DNA Lysis, 5 分钟内裂解各种细胞和组织。使用过程中无需大量样本、无需反复离心, 无需使用有机试剂, 从而获得高质量的 DNA 模板。该试剂盒可以对 <1000 个细胞或低至 10 个病毒粒子进行检测。本试剂盒仅供研究使用, 不可用于临床、食品、化妆品等领域。

试剂盒组成

组分	Nu-C0101 (50T)	Nu-C0102 (250T)
TC-DNA Lysis	1 mL	5 mL
2×Master TaqMix(With Dye)	500 μL	2 × 1.25 mL

保存条件

-20°C 保存。

TC-DNA Lysis 和 2×Master TaqMix(With Dye)长期使用可 4°C 保存, 避免反复冻融。

需要准备

水浴锅或金属恒温浴、离心机、PCR 仪

使用方法**一、不同样品的处理方法****1. 组织液的处理**

(1) 组织液包括组织研磨液、细胞悬液、全血、血清、拭子处理液等。取 10 μL 组织液*置于离心管中。

※: 棉签放入 500 μL 生理盐水或无菌水中, 浸泡 5-10 min, 用力挤压后备用。

- (2) 加入 20 μL TC-DNA Lysis。
- (3) 充分混匀。
- (4) 置于 55°C 作用 5 分钟。溶液即为 DNA 模板。

2. 组织块的处理

- (1) 用眼科剪剪取 1-2mm 的组织块, 并将组织块剪成肉泥状。
- (2) 加入 20 μL TC-DNA Lysis。
- (3) 充分混匀。
- (4) 置于 55°C 作用 5 分钟。
- (5) 10,000rpm 离心 60 秒取上清。上清即为 DNA 模板。

二、推荐 PCR 反应体系

	20 μ L 体系 (推荐)	50 μ L 体系
2 \times Master TaqMix(With Dye)	10 μ L	25 μ L
引物 1 (10 μ M) ¹	1 μ L	2 μ L
引物 2 (10 μ M) ¹	1 μ L	2 μ L
DNA 模板	0.5-2 μ L	1-3 μ L
ddH ₂ O	补齐 20 μ L	补齐 50 μ L

1: 引物浓度可以在 0.1-0.5 μ M 范围内进行调节。

三、按照以下方法设定 PCR 反应

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15-30 s	} 35-40
退火	50~72 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	1 kb/min	
彻底延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	1

注意事项

一、试剂盒使用前注意事项

- (1) 所有试剂应按照指定温度储存。请勿反复冻融。
- (2) 使用前需要对操作区进行消毒，消毒方式可以采用 75%乙醇或核酸消除剂等。耗材均使用商品化的无酶耗材。
- (3) TC-DNA Lysis 频繁使用，可在 4 $^{\circ}$ C 保存。长期不使用可放-20 $^{\circ}$ C 保存。

二、样本注意事项

- (1) 细胞无需离心，在含/不含血清的环境中均可直接使用。
- (2) 扩增 2kb 以内片段，细胞样品浓度不超过 1000 个细胞。如若扩增片段超过 2kb，可适当提高细胞浓度。
- (3) 不同组织使用不同的眼科剪和眼科镊进行处理，防止交叉污染导致检测结果偏差。
- (4) 组织样本仅需要采集 1-2mm。

三、试剂盒使用过程中注意事项

- (1) PCR 过程中推荐使用阴性对照和阳性对照。
- (2) 整个过程中使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，减少环境污染。
- (3) 2 \times Master TaqMix(With Dye)已包含染料，可在反应结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳。
- (4) PCR 产物 3'末端含有 A，可直接进行 TA 克隆。

四、试剂盒使用后注意事项

- (1) TC-DNA Lysis 处理后的 DNA 模板可在-20 $^{\circ}$ C 保存至少 1 个月。避免反复冻融，防止基因组断裂。
- (2) PCR 反应完成后，严禁在实验区开盖。应在污染区进行琼脂糖凝胶电泳，防止气溶胶污染。
- (3) 为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。

检测实例

来源	范围
细胞	293T、A549、Vero、PK15、Sp2/0、HCT-116、Marc145、ST、siHa、MCF-7
人	头发、唾液、咽拭子、指甲
小鼠	心、肝、脾、肺、肾、脑、脊柱、胃、大肠、小肠、胆囊、尾巴、脚趾、皮、耳朵、肌肉
猪	心、肝、脾、肺、肾、脑、淋巴结、咽拭子、唾液、精液
鸡	心、肝、脾、肺、胃
亚洲鲫鱼	鱼鳍、鱼泡、鱼鳞、鱼籽

常见问题解析

问题	可能原因	推荐解决方案
阳性对照和样本都未出现扩增条带	<ol style="list-style-type: none"> (1) PCR 条件并非最优 (2) 2×Master TaqMix(With Dye)保存不当 (3) 引物并非最优 	<ol style="list-style-type: none"> (1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。 (2) 2×Master TaqMix(With Dye)应在-20℃保存，使用过程中置冰浴保存。避免反复冻融。
阳性对照有条带，但是样本无条带或者条带比较弱	<ol style="list-style-type: none"> (1) PCR 条件并非最优 (2) 提取 DNA 模板上样量太大 (3) 基因组断裂或者降解 (4) 模板量不合适 (5) PCR 循环数不合适 (6) 细胞数量过多 (7) 组织块过大 (8) 扩增片段太大 	<ol style="list-style-type: none"> (1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件，包括退火温度、引物浓度等。 (2) 增大 PCR 反应体系，过多使用模板 DNA 会导致扩增效率下降，推荐使用模板量为 0.5-2μL。 (3) 推荐使用新鲜细胞或者组织样本。 (4) 模板 DNA 可在-20℃保存至少 1 个月。如果需重复检测，建议-80℃保存。 (5) 增加循环数，推荐使用 35-40 个循环，但是模板复杂，可适当增加 5 个循环。 (6) 推荐细胞数量为 1000 个细胞，如需处理大量细胞，可适当增加 TC-DNA Lysis 使用量。 (7) 推荐组织块大小为 1-2mm，如需处理大量组织块可适当增加 TC-DNA Lysis 使用量。 (8) 推荐扩增 5kb 以内基因。
非特异性条带多	<ol style="list-style-type: none"> (1) 退火温度偏低 (2) PCR 循环数过多 (3) 引物浓度过高 (4) 引物并非最优 	<ol style="list-style-type: none"> (1) 推荐使用梯度 PCR 对退火温度进行摸索。 (2) 推荐使用 35-40 个循环进行扩增。 (3) 降低引物浓度，使引物终浓度在 0.1-0.5μM。 (4) 重新设计引物。
阴性对照出现条带	<ol style="list-style-type: none"> (1) 引物污染 (2) 无菌水污染 (3) 操作工具污染 (4) 样本间交叉污染 (5) PCR 产物间污染 	<ol style="list-style-type: none"> (1) 使用耗材需要经过无酶处理。 (2) 使用移液器时防止液体飞溅。 (3) 引物分装保存。 (4) 减少开盖次数，防止气溶胶污染。 (5) 使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。 (6) 定期对样本处理区域进行消毒。