

Mouse Tail Genotype Identification kit

鼠尾基因型鉴定试剂盒（含蛋白酶 K 版）

文件编号：LD52525501； 版本编号：v1.0

试剂盒说明

本试剂盒包含快速组织裂解及扩增试剂，样本预处理试剂用于从鼠尾、组织等多种样本中快速释放基因组DNA并直接用于普通PCR扩增，具有较强的样本兼容性。本产品无需进行复杂的DNA抽提步骤，各种组织样本只需经过简单的裂解即可作为PCR扩增模板直接进行扩增。

试剂盒中配有的2xDirect Amplification Mix(Dye)包含高性能的Taq DNA Polymerase，dNTP以及优化的缓冲体系，PCR反应时只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了开管/移液等操作，显著降低了样品交叉污染并且提高了检测通量和结果的重现性。独特的保护剂使得DNA Polymerase 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。2xDirect Amplification Mix (Dye)中含有电泳指示剂，PCR反应结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，方便操作。本试剂盒适用于小鼠转基因检测、小鼠基因分型、血液直扩、菌落直扩等。

试剂盒基本信息

【产品名称】Eltbio™ 鼠尾基因型鉴定试剂盒（含蛋白酶 K 版）

【英文名称】Eltbio™ Mouse Tail Genotype Identification kit

【目录号】LD525-020

【运输条件】2~8℃

【保存条件】Lysis Buffer 常温保存；蛋白酶 K 于 4℃保存；2xDirect Amplification Mix (Dye) 于- 20℃长期保存

【有效期】12 个月

试剂盒组成

组分	LD525-020
Lysis Buffer	40 mL
蛋白酶K	1 ml
2×Direct Amplification Mix (Dye)	5×1 ml

常见问题与解决方案

1. 无扩增产物或扩增产物浓度低

- 1)可适当提高引物浓度;
- 2)设置梯度退火，找到合适退火温度;
- 3)适当增加延伸时间或增加PCR循环数;
- 4)调整模板使用量(降低使用量减少抑制物)或重新裂解;
- 5)PCR引物错误:设置以纯化过的小鼠基因组为模板的阳性对照反应。

2. 非特异较多或条带弥散

- 1)尝试提高退火温度;
- 2)适当降低引物浓度;
- 3)减少循环数;
- 4)调整模板使用量;
- 5)PCR引物错配严重，重新设计引物。

3. 阴性对照也出现扩增

- 1)PCR反应体系出现污染。

试剂盒操作步骤

样本预处理

1. 将 1-3mm 小鼠组织样本加入到 1.5ml 离心管中，加入 200 μ L 的 Lysis Buffer 和 5 μ L 的蛋白酶 K，震荡混匀，短暂瞬时离心将液体收集到管底，使样本与液体接触，56 $^{\circ}$ C 金属浴 1200rpm 孵育 30min。
2. 孵育完成后将样品置于 95 $^{\circ}$ C 条件下加热 5min，灭活蛋白酶 K。（此步骤不可忽略）
3. 瞬时离心，取上清即可进行 PCR 反应。

PCR 扩增

以下举例为常规 PCR 反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化；组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回 -20 $^{\circ}$ C 长期保存或 4 $^{\circ}$ C 短期保存。

1. PCR 反应体系

组分	20 μ L 反应体系	终浓度	50 μ L 反应体系	终浓度
2 \times Direct Amplification Mix (Dye)	10 μ L	1 \times	25 μ L	1 \times
Forward Primer, 10 μ M	0.4-0.8 μ L	0.2-0.4 μ M	1-2 μ L	0.2-0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	0.4-0.8 μ L	0.2-0.4 μ M	1-2 μ L	0.2-0.4 μ M
Template DNA	1 μ L	适量	1-2 μ L	适量
ddH ₂ O	up to 20 μ L	/	up to 50 μ L	/

注意：可等比例放大或缩小反应体系，引物浓度请以终浓度 0.2-0.4 μ M 作为设定范围的参考。

PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	2min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	25 s	35-40 个循环 ³⁾
退火	60 $^{\circ}$ C ¹⁾	25 s	
延伸	72 $^{\circ}$	1min ²⁾	
终延伸	72 $^{\circ}$	5min	1
保存	4-12 $^{\circ}$ C	∞	

注意：

- 1) 退火温度根据引物的Tm值进行设置；如无法得到理想的条带，可梯度改变退火温度扩增；发生非特异性反应时，适当提高退火温度；
- 2) 延伸速度为 30sec/kb，可根据扩增片段大小进行调整；扩增产物在 2kb 以内效果最佳；
- 3) 循环数：可根据扩增产物的下游应用设定循环数。

结果检测

反应结束后取 5-8 μ L 反应产物，直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

* 本产品仅供科学研究使用 版权声明：上海英莱盾生物技术有限公司保留本试剂盒说明书所有权利