

Version 1

Code No. AG12310

# *AdeptTect* 小鼠组织快速 PCR 试剂盒(含染料)

# *AdeptTect* Mouse Tissue Fast PCR Kit (dye plus)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

## ➤ 产品概述

本产品专为快速对小鼠组织（鼠尾、鼠趾、鼠耳等）进行 PCR 扩增反应而研制，配备强力的组织消化液，能够迅速地从小鼠尾巴等组织中释放足量的基因组 DNA，产物可直接进行 PCR 扩增，无需过夜消化、酚氯仿抽提或柱式纯化等操作，极大缩短了实验耗时，简化了操作过程以及降低了污染几率。

同时本产品具有极高的扩增效率及耐受性，对简单或复杂模板、短片段或长片段的 PCR 扩增都具有良好的适应性，可耐受 20%鼠尾裂解液模板。

本产品具有较快的延伸速度，可在短时间内获得检测结果。进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增；同时本产品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂，溶液呈现紫红色；PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。这种预混液方案操作简便，可最大限度地减少人为误差。

本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR，有效的抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。本产品扩增得到的 PCR 产物 3' 端不含 A 碱基，因此不可直接用于 TA 克隆。

## ➤ 产品组成

组分名称	( 120 rxns / 50 $\mu$ l )
2X Mouse Tissue Fast PCR Master Mix (dye plus)	500 $\mu$ l X 6 pcs
Mouse Tissue Lysis Buffer	12 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	120 $\mu$ l

## ➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. **简单快速**：无需耗时且繁琐的 DNA 纯化步骤，5 min 即可快速释放 DNA。
2. **适用广泛**：适用于从小鼠尾巴、耳朵以及脚趾等组织中一步法提取的粗裂模板。
3. **高效扩增**：延伸速度快，4 kb 以下片段扩增速度最快可达 5 sec/kb。
4. **耐受性强**：更强的抑制物耐受性，最高可耐受 20%粗裂模板。

## ➤ 实验原理

### PCR 扩增原理

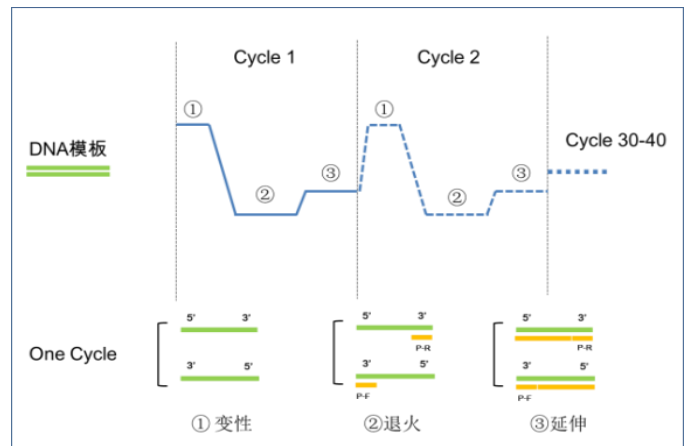
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链。



## ➤ 实验前准备

### 1. 试剂& 耗材：

Primer、PCR 管、枪头、DNA 模板、新鲜的鼠组织。

### 2. 仪器：

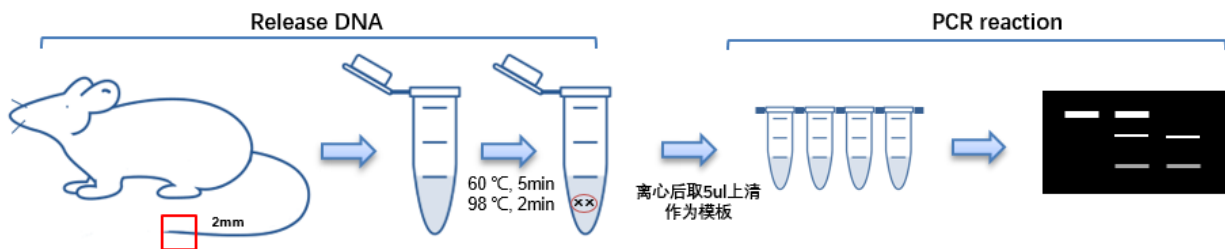
PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 操作方法

### 1. 样本的处理：

1) 纯化后的 DNA：加入 ≤ 500 ng 纯化后的 DNA 至 PCR 反应液中进行反应即可。

2) 简单裂解方法：（现配现用）



- ① 取 2-5mm 鼠尾<sup>\*1</sup>（鼠耳、鼠趾）（样本加入量可参考 Table. 1 简单裂解样本加入量表）；
- ② 往样本中加入 100  $\mu$ l 的 Mouse Tissue Lysis Buffer 和 1  $\mu$ l Proteinase K，充分混匀；
- ③ 60 $^{\circ}$ C 反应 5 min<sup>\*2</sup>（反应时间一般推荐 5 min，若裂解效果不好，可适当的延长裂解时间，在 5~30 min 范围内调整）；
- ④ 98 $^{\circ}$ C 反应 2 min；反应完后将裂解样本放置于冰上；
- ⑤ 室温下桌面离心将不溶物离心至管底<sup>\*3</sup>，将上清液转移至新的离心管中；放置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 备用；配制后应尽快使用，若当天不使用，可保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C；
- ⑥ 取 5  $\mu$ l 的上清液，按照本产品进行 PCR 反应（上清液体积根据实验结果进行调整，如在 2~5  $\mu$ l 范围内调整）。

Table. 1 简单裂解样本加入量表

样本类型	简单裂解样本添加量
鼠耳	4-10 mm <sup>2</sup>
鼠尾	2-5 mm
鼠趾	1-2 根鼠趾

- \*1: 鼠尾不易剪切太长，应尽量剪碎，以便裂解更充分；裂解后样本应尽快使用，防止冻存过久或反复冻融导致基因组 DNA 降解。
- \*2: 若目的基因为较难扩增的基因、裂解的组织取自生长周期较长的成熟小鼠或组织冻存时间较久，可适当延长裂解时间（在 5min~30min 范围内调整）。
- \*3: 裂解后的产物充分离心，去除杂质，减少杂质对扩增反应的影响。

## 2. PCR 反应

### 1) 配制 PCR 反应液

首先按照下表所示配制 PCR 反应液<sup>\*1</sup>。然后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系 <sup>*4</sup>
2X Mouse Tissue Fast PCR Master Mix (dye plus) <sup>*2</sup>	1X	25 $\mu$ l
Template	-	$\leq$ 5 $\mu$ l <sup>*3</sup>
Primer F (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M <sup>5</sup>	1 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M <sup>5</sup>	1 $\mu$ l
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

- \*1: 为了获得更好的扩增特异性，建议在冰上配制反应液。
- \*2: 溶液应避免反复冻融，防止降低酶活性；首次使用时，短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部后进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
- \*3: 使用纯化的 DNA 模板，一般推荐  $\leq$ 500 ng；简单裂解后的模板推荐用量 5  $\mu$ l（50  $\mu$ l

体系)，具体可根据实验结果调整（2~5 μl）；若裂解模板中的基因含量较少，可适当增大模板添加量，最大不超过体系的 20%（10 μl）。

\*4: 推荐使用 50 μl 体系，可获得较好的 PCR 扩增效果；若改变反应总体系，则应按比例减少各组分的加入量（例如 25 μl 体系中，模板添加量应降低为 2.5 μl）。

\*5: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM，可根据实验结果在 0.1~0.4 μM 范围内调整。

## 2) 反应条件（以三步法 PCR 扩增为例<sup>\*6</sup>）

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中，然后按照下表条件进行 PCR 反应：

步骤	温度	时间	循环数
预变性 <sup>*1</sup>	98°C	2 min	1
变性 <sup>*2</sup>	98°C	10 sec	} 30~35 <sup>*5</sup>
退火 <sup>*3</sup>	55°C	30 sec	
延伸	68°C	20 sec / kb <sup>*4</sup>	

\*1: 若扩增简单裂解产物，一般将预变性设置为 98°C 2 min（可在 2~5 min 范围内调整）。

若扩增纯化后 DNA 模板，根据不同的目的片段，可省略预变性步骤。

\*2: 变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 94°C 10~15 sec，98°C 5~10 sec。

\*3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T<sub>m</sub> 值，通常可按照 T<sub>m</sub> ± 5°C 设定，对于特异性较差的引物可适当调高 T<sub>m</sub> 值（~60°C）。

\*4: 4k 以内片段延伸速度推荐 20 sec / kb，可根据需求在 5 ~ 30 sec / kb 范围内调整，4k 以上或较复杂片段扩增速度推荐在 30 sec ~ 1 min / kb 范围内调整。

\*5: 一般推荐使用 30 个循环进行扩增，若扩增条带较弱，可尝试增加循环数。

\*6: 当引物 T<sub>m</sub> 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好，可尝试两步法 PCR 扩增（两步法 PCR 反应程序可参考附录）。

## 3) 结果检测

反应结束后，取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

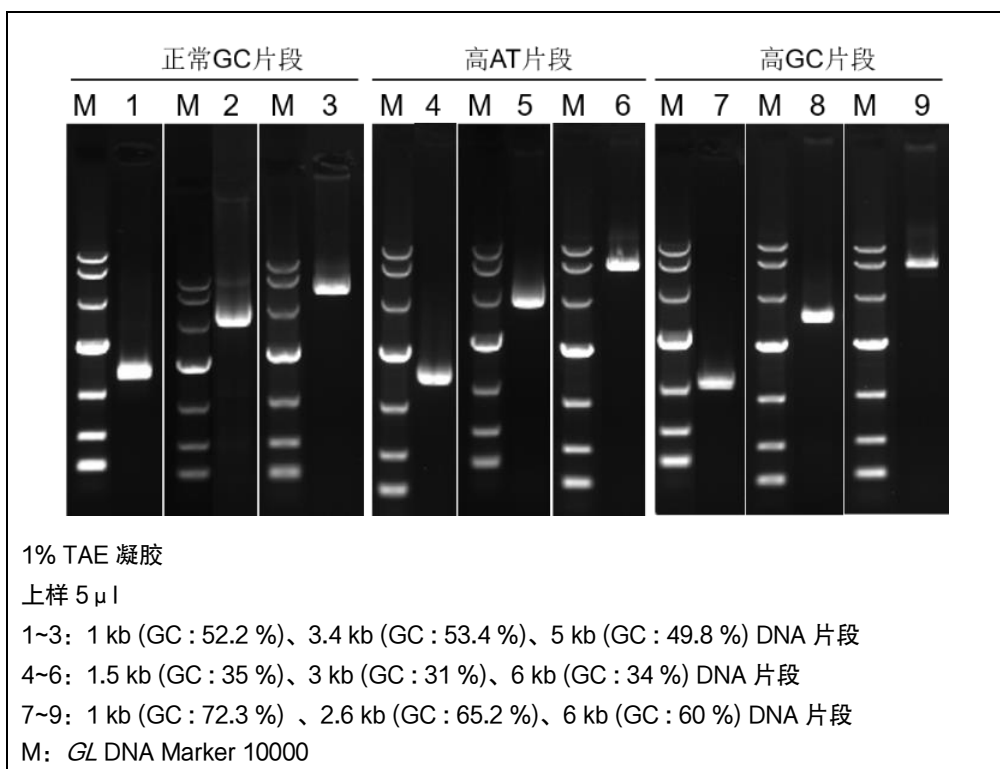
## ➤ 实验例

1. 采用本产品扩增小鼠不同复杂程度及不同长度的片段，以鼠尾裂解液为模板，都能获得很好的扩增效果。

### 反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
68°C	5~30 sec/kb	

电泳结果如下图所示：

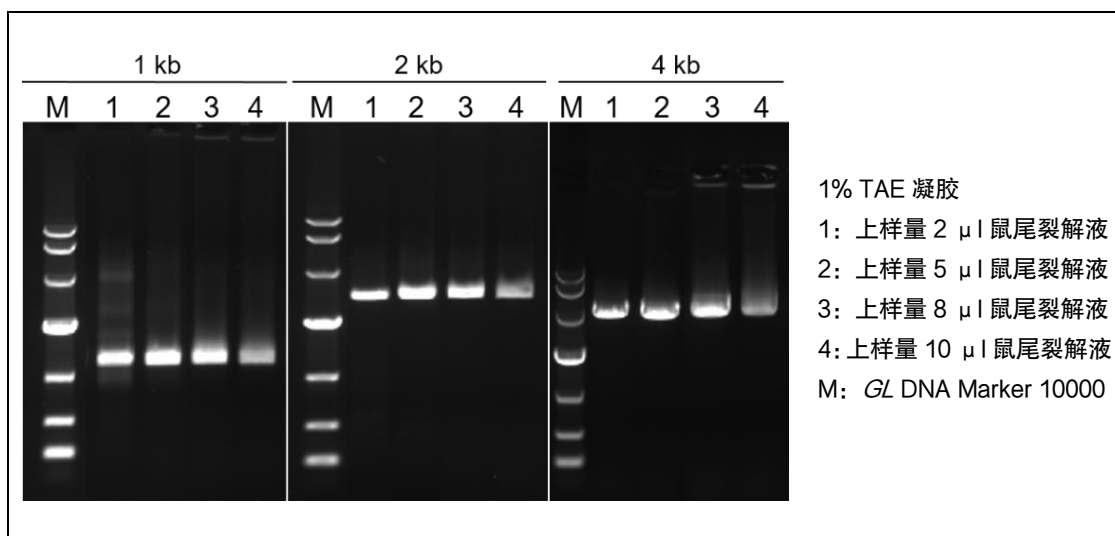


2. 使用不同鼠尾裂解液添加量 ( 4%~20% ) ， 采用本产品都能获得很好的扩增效果。

**反应程序：**

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
68°C	5~30 sec/kb	

电泳结果如下图所示：

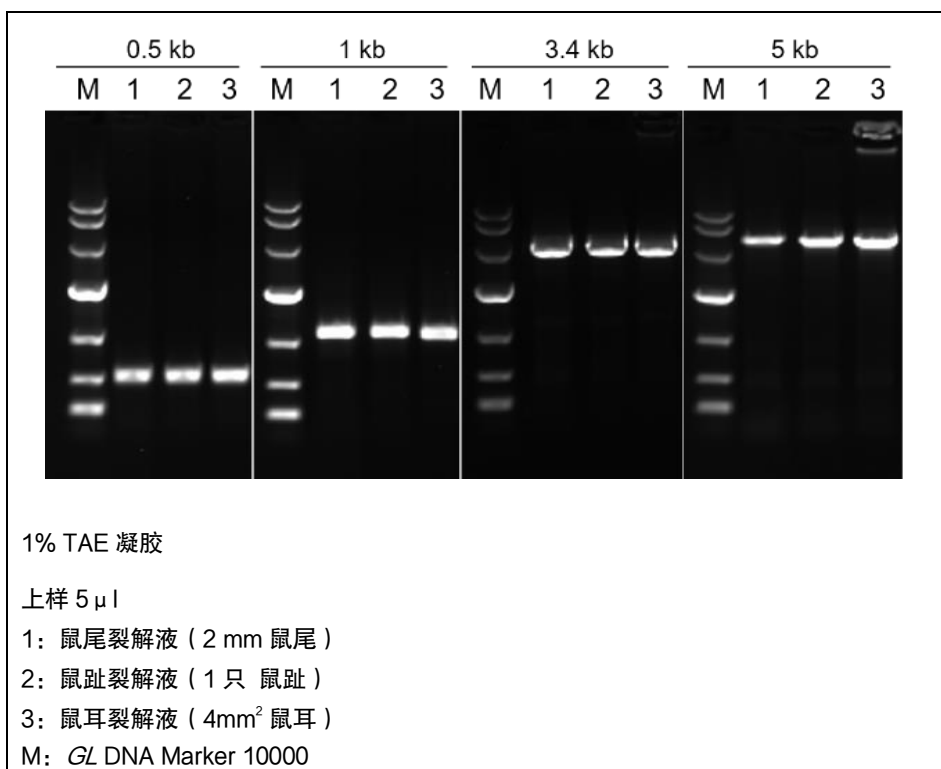


3. 采用本产品扩增小鼠不同组织裂解样本（鼠尾、鼠趾、鼠耳），都能获得很好的扩增效果。

**反应程序:**

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 sec	
68°C	5~30 sec/kb	

电泳结果如下图所示:



## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板

- ❖ 建议使用新鲜的小鼠组织，若为长期冷冻组织，应尽量避免反复冻融，否则会导致模板的降解，提取的基因组 DNA 不完整或提取量降低，影响后续的 PCR 效率。
- ❖ 选择合适的模板类型：小鼠不同组织基因表达量可能存在差别，应根据扩增目标片段和实际扩增需求选择合适的小鼠组织作为裂解样本。
- ❖ 为尽量避免粗裂模板中抑制物过多残留，在样本裂解过程中，请注意以下几点：
  - 1) 样本(鼠尾)组织尽量剪碎，不应使用过长的、未剪碎的鼠尾组织进行裂解处理；
  - 2) 剪切后的鼠组织应完全浸没于裂解液之中，并充分混匀后再进行反应；



- 3) 反应结束后的产物，必须充分离心（离心越充分，管底的白色沉淀越多），取上清为 PCR 反应模板。
- ❖ 小鼠组织简单裂解的产物中存在一定的 PCR 抑制物，反应时加入量过多可能会抑制反应导致扩增失败，可尝试减少样本加入量或将样本稀释后使用，推荐添加小鼠组织裂解液不超过体系 20%。
  - ❖ 若一次性处理样本过多，操作不能保持一致或较粗糙，为保证良好的 PCR 效果，使用本产品时有以下建议：
    - 1) 减少模板添加量，以 5  $\mu$ l 为基础下调（2~5  $\mu$ l / 50  $\mu$ l 体系）；
    - 2) 每次添加粗裂模板前，充分离心，将抑制物沉淀管底，取上清；
    - 3) 反应体系配制完成后充分混匀，但请勿剧烈震荡，以免影响聚合酶的活性；
    - 4) 裂解后的模板及配制的反应体系于冰上放置，防止模板的降解或聚合酶活性的丧失。

## 2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4  $\mu$ M。
- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
  - 1) 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 % 之间；
  - 2) 建议正反向引物  $T_m$  值在 50-70 $^{\circ}$ C，两引物  $T_m$  值相差不超过 5 $^{\circ}$ C；
  - 3) 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域；
  - 4) 引物 3' 端避免出现发夹结构；
  - 5) 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。

## 3. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，出现引物二聚体。
- ❖ 若设计的引物特异性较差，且不便更换引物时，建议升高退火温度，推荐 60 $^{\circ}$ C 左右。

## 4. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始浓度，一般推荐 30-35 个循环。若扩增条带较弱，可尝试增加循环数；若存在非特异性扩增，可尝试减少循环数。



## 5. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域建议分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验可设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

## ➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

( 两步法 PCR 反应程序 )

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	} 30-35
延伸	68°C	20 sec / kb	