

EZ-press Tissue Direct PCR Kit

说明书

Cat. No.: EZB-TDP1

一、产品简介

本试剂盒专门用于小鼠基因型的鉴定，包含基因组 DNA 释放和 PCR 扩增体系。本试剂盒能快速从小鼠耳朵、尾巴、脚趾等组织中释放完整的基因组 DNA，无需匀浆、过夜消化、酚氯仿抽提、DNA 沉淀或者柱式纯化等操作，极大地缩短实验操作时间。使用时，直接将组织浸没在预混 Proteinase Mix 的 Lysis Buffer 中，55°C 孵育消化 15 min 后 95°C 加热 5 min 灭活 Proteinase。裂解产物离心后的上清液可直接作为模板用于 PCR 扩增反应。

本试剂盒中的 2x Direct-PCR Mix (Dye plus) 包含具有超强扩增能力和抗干扰能力的 DNA Taq Polymerase, dNTPs 及高度优化的缓冲体系。PCR 反应时只需加入模板和引物即可进行扩增，显著提高了检测的通量和结果的重现性。体系中还预混了染料，PCR 反应结束后可直接上样跑电泳。PCR 产物的 3'端带有碱基 A，可直接克隆至 T 载体。本试剂盒应用范围广，尤其适用于小鼠的基因分型、转基因检测及基因敲除分析。

二、产品组分

产品组分	EZB-TDP1 (200 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-TDP1-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
Lysis Buffer	20 ml	50 ml
Proteinase Mix	0.4 ml	1 ml
2x Direct-PCR Mix (Dye plus)	2 ml	5 ml

三、保存条件

本产品的 Lysis Buffer 建议置于 2~8°C 避光保存；其余组分建议置于 -20°C 保存。过期日期详见产品标签的有效期信息。

四、应用范围

应用于小鼠基因分型、小鼠转基因检测、小鼠基因敲除分析。

五、操作步骤

DNA 提取

1. 建议的组织使用量：

组织类型	小鼠耳朵	小鼠尾尖	小鼠脚趾
使用量	2~5 mm ²	1~3 mm	1~2 个

2. 根据需要裂解的小鼠组织样品数量配制组织消化液，单个样品所需的组织消化液配制方法如下：

试剂	组织消化液（单个样品）
Proteinase Mix	2 µl
Lysis Buffer	100 µl

上述组织消化液应现配现用，各试剂添加完后应使用移液器或者涡旋震荡混匀后再使用。

3. 取 100 µl 新鲜配制的组织消化液加入到所需裂解的组织样本中，涡旋震荡后在 55°C 的水浴锅/金属浴中孵育 15 min。消化时，务必将组织完全浸没于组织消化液中（很重要）。

对于常规大小目标片段，15 min 孵育足以释放足量的 DNA 模板。孵育时间也可根据实际情况进行调整，下表为不同长度的扩增片段在 55°C 下所推荐的孵育时间：

扩增片段长度	推荐55°C孵育的时间
~ 500 bp	10 min
~ 1000 bp	20 min
~ 1500 bp	30 min

注：孵育完成后，组织可能看起来仍然完好无损，但足量的基因组DNA已经释放，能够满足PCR检测。

- 孵育完成后，将上述组织消化产物置于95°C水浴/金属浴中孵育5 min以灭活消化液中的蛋白酶活性。
- 将裂解产物涡旋震荡充分混匀后，12000 rpm 离心 5 min，取上清即可作为模板用于 PCR 反应。消化后的上清液可于-20°C 保存 3 个月。

PCR 扩增

- 使用前，将 2x Direct-PCR Mix (Dye plus)从-20°C 冰箱中取出，室温放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 5 ~ 10 次充分混匀（非常重要），然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上待用。在冰浴上进行反应体系的配制：

成分	20 µl 体系	50 µl 体系
上述消化产物的上清液*1	1 µl	2 µl
2x Direct-PCR Mix (Dye plus)	10 µl	25 µl
正向引物 (10 µM)	0.5 µl	1 µl
反向引物 (10 µM)	0.5 µl	1 µl
ddH ₂ O (Nuclease-free 或者灭过菌的)	补足到 20 µl	补足到 50 µl

注：*1. 上述消化产物的上清液的加入量不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

上述反应体系配制好后，将移液器量程调至所配制体系的 90%，吹打 10 ~ 20 次使之充分混匀后（很重要），使用离心机短暂离心至管底，再进行 PCR 反应。

- PCR 反应程序设置如下：

Step	1	2			3
	预变性	PCR 反应			彻底延伸
循环数	1 cycle	35 cycles			1 cycle
		解链	退火*1	延伸	
温度	94°C	94°C	55 ~ 60°C	72°C	72°C
时间	5 min	30 sec	30 sec	30 sec/kb	5 min

注：*1. 退火的温度需要根据引物 Tm 值进行调整，一般退火温度设置为低于引物的 Tm 值 1 ~ 2°C 即可。

- 扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测，无需添加 DNA Loading Buffer。

六、常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
扩增产量低或者无法扩增	PCR 反应退火温度设置太高	降低退火温度，每次降低 3°C
	PCR 的循环数不够	适当地增加循环数
	PCR 引物质量问题	重新设计 PCR 引物
	模板含量太低	适当加大模板量
	组织消化不够充分 蛋白酶未被完全灭活	延长 55°C 孵育时间至 30 min 灭活步骤可在沸水浴中进行
存在非特异性扩增	PCR 反应退火温度设置太低	提高 PCR 退火温度，每次提高 2°C
	PCR 引物错配	重新设计 PCR 引物
	配制 PCR 反应体系时温度太高或配制完成后放置时间太久	PCR 反应体系的配制在低温下进行，配制完成后尽快进行 PCR 扩增反应