

# 鼠尾直接 PCR 试剂盒(快速基因型鉴定)

## 产品组分

产品组分	B40013 (200 rxns)	B40015 (500 rxns)
Buffer L (mL)	20	50
Protease Plus (mL)	0.4	1
2 x M-PCR OPTI™ Mix (mL)	2	5

### 1. 组织消化

按小鼠数量配制组织消化液，试剂比例如下：

	单样本
Protease Plus	2 μL
Buffer L	100 μL

组织消化液现用现配，充分混匀后使用。

1.2. 向每个含有样本的 EP 管中加入 100 μL 新鲜组织消化液，55°C 水浴/金属浴中消化 30 min。组织消化时，务必将组织完全浸没于消化液中。消化完成后，组织外观上仍然完整，但足量的基因组 DNA 已经释放，不影响后续的 PCR 实验。

1.3. 将样本置于 95°C 水浴/金属浴中孵育 5 min 以灭活消化液中的蛋白酶。12000 rpm 离心 5 分钟，取上清作为 PCR 模板。消化后的上清可于-20°C 保存三个月。

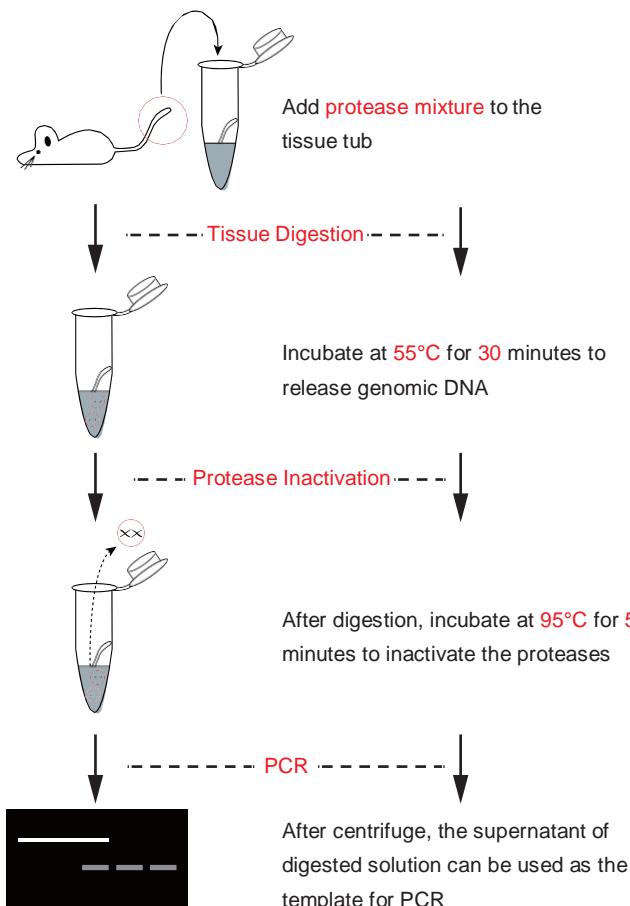
### 2. PCR 扩增

2.1. PCR 反应体系：反应体系的配制最好于低温环境下（如冰浴）完成，以保证 PCR 扩增效率和扩增特异性。

PCR 反应组分	20 μL 反应体系 (μL)	50 μL 反应体系 (μL)
ddH <sub>2</sub> O	7	18
正向引物 (10 μM)	0.5	1
反向引物 (10 μM)	0.5	1
模板（消化产物）	2	5
2 x M-PCR OPTI™ Mix	10	25

Temperature (°C)	Time	Cycles
94	5 min	1
94	20 sec	35-40
50-65	30 sec	
72	X min (2 kb /min)	
72	5 min	1
12	--	1

PCR 产物的 3' 端带有碱基 A，可直接克隆至 T 载体，用于 DNA 测序。



### 3. 琼脂糖凝胶电泳

试剂 2 x M-PCR OPTITM Mix 中含有溴酚蓝染料，PCR 产物可直接点样进行琼脂糖凝胶电泳。

## 常见问题及对策

常见问题	可能原因	对策
样本组与阳性对照组均无扩增条带	PCR 反应条件设置不当	优化 PCR 反应条件
	PCR 引物质量问题	重新设计 PCR 引物
样本组无扩增条带而阳性对照组正常	不当储存或长期储存引起试剂活性丧失	使用新鲜的试剂
	组织消化不够充分	延长 55°C 消化时间至 60 min
	蛋白酶未被完全灭活	消化产物在 95-100°C 孵育 5 min
存在非特异性扩增条带	PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高	增加 PCR 退火温度，降低 PCR 循环数、引物浓度或模板浓度
	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