

快速鼠尾基因型鉴定（PCR 法）试剂盒

说明书

产品组分

组分名称	M00301-100T	M00301-500T	M00301-1000T	存储条件
鼠尾裂解液	10 ml	25ml×2	25ml×4	4°C
蛋白酶 K	1 ml	1 ml×5	1ml×10	-20°C
2×PCR Easy Mix	1ml	1ml×5	1ml×10	-20°C

实验方法

1、组织消化

1.1 按照小鼠数量配制组织消化液，试剂比例如下：

	单样本
蛋白酶 K	10 μ l
鼠尾裂解液	100 μ l

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 μ l 新鲜组织消化液，55°C 水浴/金属浴中消化 30 分钟。组织消化时，请务必将组织完全浸没于消化液中。消化完成后，组织外观上依然完整，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 分钟以灭活消化液中蛋白酶。12000rpm 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 反应体系的配制：

最好于低温环境下（如冰浴中）完成，以保证 PCR 扩增效率和特异性。

PCR 反应组分	20 μ l 反应体系	50 μ l 反应体系
模板（消化产物）	2 μ l	5 μ l
正向引物（10 μ M）	0.5 μ l	1 μ l
反向引物（10 μ M）	0.5 μ l	1 μ l
2×PCR Easy Mix	10 μ l	25 μ l
ddH ₂ O	7 μ l	18 μ l

2.2 PCR 反应条件：

温度 (°C)	时间	循环数
94	5 min	1
94	20 sec	35-40
50-65	30 sec	
72	X min (1kb/min)	
72	5 min	1
4	--	1

3、琼脂糖凝胶电泳

试剂中含有溴酚蓝染料，PCR 产物可以直接点样进行琼脂糖凝胶电泳。另外 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。

常见问题及对策分析

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 60min
	蛋白酶未被完全灭活	消化产物在 95°C 孵育 5min
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，配制完成后请尽快进行 PCR 扩增反应

上海东寰生物科技有限公司

SHANGHAI DONGHUAN BIOTECH CO., LTD

公司网址:www.dhbiotech.com QQ 咨询:3295258699

电话咨询:021-39965016 邮箱:market@dhbiotech.com