

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格 1	规格 2
		100 RXN(25 µL/RXN)	5 × 100 RXN(25 µL/RXN)
Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping	RM20397	1.25 mL	
Tissue Lysis Buffer II*	RM20831	20 mL	100 RXN × 5

\*注: 裂解试剂包含蛋白酶 K, 4 周以内, 可存放于 4°C/室温, 若超过 4 周存放, 建议放置于 -20°C 冰箱。

## 产品说明

本试剂盒包含整套的组织裂解液和 PCR 扩增体系, 适用于小鼠基因型快速鉴定 (Genotyping)。本试剂盒可用于从小鼠尾巴、耳朵以及脚趾等组织中快速释放基因组 DNA, 产物可直接进行 PCR 扩增, 极大缩短了实验耗时。使用时, 将组织浸泡在裂解液中, 55°C 孵育 15 min 后, 95°C 加热 5 min 灭活蛋白酶 K。裂解产物经离心后可直接用做 PCR 扩增模板, 经反复测试广泛适用于 4 kb 以内目标片段扩增, 并适用于 4 对引物以上的多重 PCR 反应, 超过 4 Kb 以上的片段需要进行优化条件。

试剂盒中组织裂解液已经包含了蛋白酶 K, 不需要额外配制, 性能稳定, 放置于室温或 4°C 保存 4 周, 对裂解性能无影响, 可有效避免了组织裂解液的反复冻融。

试剂盒中配有 Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping, 包含高性能的 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。Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。体系中包含了 DNA Loading 染料, 可在反应结束后直接进行电泳, 使用方便快捷。

## 保存温度

-20°C

## 操作说明

### 标准操作

- 取干净的 1.5 mL EP 管, 向 EP 管中加入鼠尾 (鼠尾、鼠趾推荐 1-2 mm 或 3-5 mg, 鼠耳推荐 1-5 mm<sup>2</sup> 或 3-5 mg)。
- 向 EP 管中加入 200 µL Tissue Lysis Buffer II, 完全淹没组织。

注: Tissue Lysis Buffer II 使用前, 需放置至澄清状态。

- 推荐裂解反应如下:

步骤	温度	时间
裂解	55°C	15 min
灭活	95°C	5 min

注: 组织裂解时, 务必将组织完全浸没于组织裂解液中。裂解完成后, 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。

- 裂解后进行 12,000 rpm, 离心 2 min, 取上清进行 PCR 反应。上清可在 -20°C 保存至少三个月。

注: 上清 -20°C 冻存后再使用, 需注意在使用前放置至澄清状态。

推荐的反应体系如下:

组份	25 µL	终浓度
Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping*	12.5 µL	1X
上游引物(10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
下游引物(10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
裂解产物	1-2 µL	/
Nuclease-free Water	to 25 µL	N/A

\*注: 试剂 Powerpol HS 2X PCR Mix for Mouse Genotyping 中含有 DNA Loading 染料, PCR 产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳, 不用另外添加 Loading buffer。

推荐的 PCR 反应程序如下：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	} 30-35
退火	55-65°C	20-30 s	
延伸	72°C	30-60 s/kb*	
终延伸	72°C	1-5 min	1
Hold	4-12°C	-	1

\*，注：4 kb 以下片段，按照 30 s/kb 扩增，4 Kb 以上片段，按照 60 s/kb 扩增。

### 常见问题及对策

#### 1. 扩增产量低或者无法扩增：

- a. 裂解不充分，建议 55°C 裂解时间延长至 3 h；
- b. 抑制剂作用：可尝试稀释样本 2 倍-5 倍后进行扩增；
- c. 蛋白酶 K 没有被充分灭活：可以延长灭活时间为 30 min；
- d. 扩增片段较长：扩增速度设置为 1 kb/1 min，同时延长终延伸时间至 10 min 或采取两步法扩增长片段。
- e. PCR 引物问题：设置阳性对照反应。

#### 2. 存在非特异性扩增条带：

- a. 配制 PCR 体系时环境温度过高：冰上配制反应体系，配完尽快开始 PCR 反应；
- b. PCR 体系中引物浓度或 DNA 模板浓度过高：适当降低引物和模板用量；
- c. 退火温度过低或循环数太高：提高退火温度，或降低循环数，可以进行梯度优化实验；
- d. PCR 引物错配：重新设计 PCR 引物。