

鼠尾基因型快速鉴定试剂盒说明书

产品组成

鼠尾基因型快速鉴定试剂盒	20 次制备	200 次制备	500 次制备
Cat. No.	7812020	7812200	7812500
样本裂解液	1 ml×2	10 ml×2	10 ml×5
蛋白酶 K 贮存液	100 µl	1 ml	1.25 ml×2
2×PCR Mix	200 µl	1 ml×2	1 ml×5
ddH ₂ O	200 µl	1 ml×2	1 ml×5
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃储存（样本裂解液可室温储存），有效期为两年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒专为小鼠快速基因型鉴定而研制，能够迅速从小鼠尾巴、耳朵或脚趾等组织中释放足量的基因组 DNA，消化时间仅需 10 分钟，无需抽提与纯化，可直接将消化产物作为模板进行 PCR 扩增。

本试剂盒提供的 2×PCR Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液，Taq Plus DNA 聚合酶、PCR 增强剂和蛋白稳定剂协同提高了 PCR 效率和灵敏度。扩增得到的目的产物 3'端附有一个 A 碱基，可以直接克隆于 T-Vector 中。产品中含有蓝色电泳指示染料，扩增产物可直接进行琼脂糖电泳检测。

用户需自备的试剂与物品

1. 1.5 ml 离心管、PCR 反应管
2. 移液器及吸头（为避免样本间的交叉污染，请选用含有滤芯的移液器吸头）
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 PCR 反应管的转子）
5. 水浴锅或干浴锅、普通 PCR 仪

使用前准备

1. 将水浴锅或干浴锅温度设置到 56℃和 95℃。
2. 收集样本，小鼠不同组织样本取样大小参考范围如下：

样本种类	取样大小
尾巴或脚趾	1-2 mm 或 3-5 mg
耳朵	<5 mm ² 或 3-5 mg
脏器	<20 mm ²

操作步骤

1. 组织消化

- (1) 按样本数量配制组织消化液，试剂比例如下：

	单样本用量
样本裂解液	100 μ l
蛋白酶 K 贮存液	5 μ l

组织消化液现用现配，充分混匀后再使用。

- (2) 向每个含有小鼠组织样本的 1.5 ml 离心管中加入 100 μ l 组织消化液，务必将组织完全浸没于消化液中，盖上管盖，56°C 消化 10 分钟。

* 消化后若组织外观上仍然较为完整也无须担心，已有足量的基因组 DNA 释放出来，不会影响后续的 PCR 实验。

* 若从 3 个月以上的小鼠组织中提取 DNA，可增加消化液体积至 200 μ l 或适当延长消化时间。

* 如果目的基因为难扩增基因，建议延长消化时间至 30 分钟。

- (3) 低速离心数秒使离心管管盖上的液体沉降到管底，然后 95°C 处理 5 分钟。

* 低速离心数秒的步骤不可省略，否则管盖上残留的蛋白酶 K 未经 95°C 失活，可能影响后续的 PCR 扩增。

- (4) 最高速 ($\geq 13,000$ 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。

* 为保证 PCR 扩增效率（尤其是对于难扩增基因），PCR 模板需尽快使用。

2. PCR 扩增

- (1) 将 2 $\times$ PCR Mix、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。

- (2) 将解冻后各个组分上下翻转混合均匀，按下表配制 PCR 反应液：

2 $\times$ PCR Mix	10 μ l
正向引物 (10 μ M)	0.5 μ l
反向引物 (10 μ M)	0.5 μ l
模板	1 μ l*
ddH ₂ O	8 μ l
Total	20 μ l

* 可以适当增减模板量，以增加目的条带的亮度或减少非特异性杂带扩增。

- (3) 盖上管盖，手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，简短离心。

- (4) PCR 反应程序设置举例

94°C	3 min	
94°C	30 sec	} 35 Cycles
55°C*1	30 sec	
72°C	30 sec*2	
72°C	5 min	

*1 以实际最佳退火温度为准。

*2 以 2 kb/min 计算。

3. 结果检测

取 5-10 μ l 扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000