

## 一步法鼠基因型鉴定试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D7284S	一步法鼠基因型鉴定试剂盒	100次
D7284M	一步法鼠基因型鉴定试剂盒	500次

### 产品简介:

- 碧云天生产的一步法鼠基因型鉴定试剂盒, 即One-step genotyping assay kit for rodents, 是一种特别便捷的使用鼠血样品一步法直接进行PCR, 从而实现鼠基因型快速鉴定的试剂盒。无须抽提基因组DNA, 血液样品可以直接用于PCR。并且PCR结束后可以直接上样电泳, 无需添加上样缓冲液。
- 本试剂盒采用了耐血的HemoTaq™ DNA聚合酶, 这是一种经过基因工程改造的非常高效的适用于EDTA、肝素或柠檬酸钠抗凝血样品或干血斑样品直接PCR检测的耐热DNA聚合酶, 确保了本试剂盒可以快速便捷地用于鼠基因型鉴定。
- **对于全血样品可以直接PCR检测, 无须提取DNA。**本产品对小鼠、大鼠等全血中血红素等各种PCR抑制剂表现出超强的抗性, 对于新鲜采集的、4°C保存或低温冻存EDTA、肝素或柠檬酸钠抗凝的人或小鼠血液样品或者干血斑(如whatman903或FTA采血卡上的干血斑), 都无需进行DNA提取纯化, 可以直接用于PCR扩增目的DNA。
- **所需血量少, 耐血能力高。**本产品用于20μl的PCR扩增体系时, 通常仅加入约1μl抗凝全血即可顺利完成PCR检测。20μl的PCR扩增体系中最大加入的血液量可以达到4μl, 即20%体积, 但通常建议使用1μl血液样品。
- **兼容EDTA、肝素或柠檬酸钠三种常见抗凝血。**血液样品用于PCR检测时, EDTA、肝素或柠檬酸钠抗凝血都可以兼容的。如果希望取得最佳的检测效果, 优先推荐EDTA抗凝血。因为EDTA可以螯合多种核酸酶发挥酶活性所必须的金属离子, 从而可以更好地抑制核酸的降解。
- 本试剂盒提供了一对阳性对照引物, 便于确认PCR检测效果。该对引物是一种小鼠、大鼠和人的通用引物, 可以扩增小鼠、大鼠或人基因组DNA中β-actin基因的300bp DNA片段。
- **本产品的耐血体积百分比可以达到20-50%, 但推荐血液用量为5%。**本产品用于肝素、柠檬酸钠和EDTA抗凝血PCR检测的效果参考图1。图中可见, 本产品对肝素(heparin)、柠檬酸钠和EDTA处理的全血的耐受体积百分比可以达到50%、20%和30%。尽管本产品有很好的耐血效果, 实际使用时最优先的推荐血液用量为5%。实际使用时, 可能会因为高血脂等异常血液, 导致血液用量加大, 从而会存在PCR效果下降的风险。

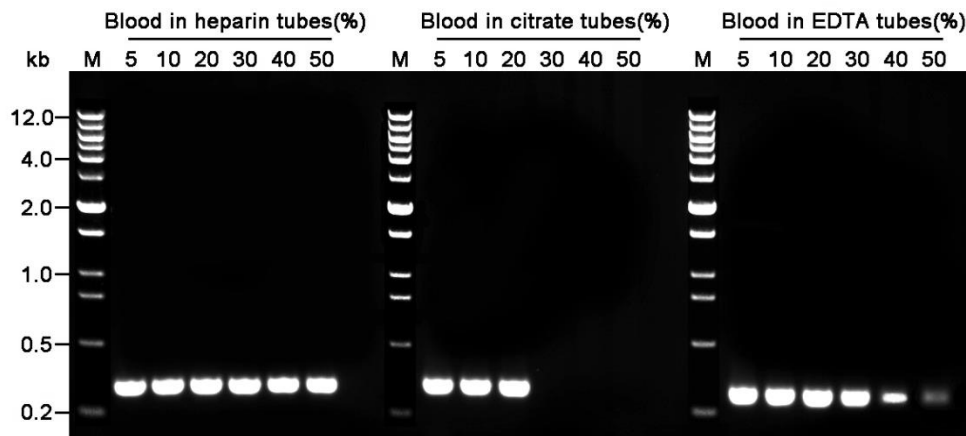


图1. 碧云天生产的一步法鼠基因型鉴定试剂盒扩增图中所示不同抗凝剂采集的抗凝全血中目的基因的电泳效果图。使用一步法鼠基因型鉴定试剂盒及本试剂盒提供的Control primer mix, 在PCR体系中直接加入5-50%不同体积百分比的不同抗凝剂采集的抗凝血, 用于扩增β-actin基因的300bp DNA片段后的电泳效果图。M, DNA marker (D0110, DNA Ladder (0.2-12 kb, 12 bands))。

- 本产品中含有的HemoTaq™ DNA Polymerase (Blood-resistant)的保真性和Taq DNA聚合酶相近, 因此本产品建议主要用于基因型鉴定目的。如果目的是为了克隆特定基因, 推荐使用D7243S/M HemoTaq™ HF DNA Polymerase (Blood-resistant)或者D7287S/M Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (HF, 2X)。
- **本产品可以轻松扩增长达5kb的目的片段。**本产品扩增不同长度目的基因的效果参考图2。图中可见, 本产品以柠檬酸钠抗凝血为模板可以直接PCR扩增长达5kb的DNA片段。

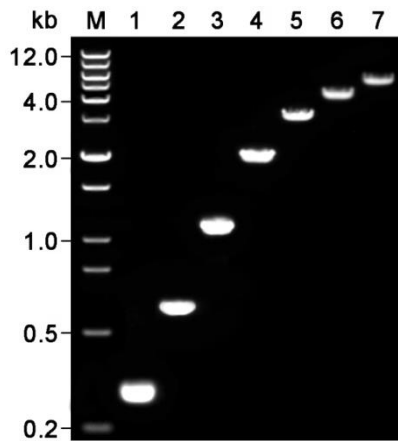


图2. 碧云天生产的一步法鼠基因型鉴定试剂盒直接以10%柠檬酸钠抗凝全血为模板扩增不同长度的目的基因的效果图。M, DNA marker (D0110 DNA Ladder (0.2-12 kb, 12 bands)); 1,  $\beta$ -actin (300bp); 2, CCR5 (630bp); 3, CCR5 (1100bp); 4, CCR5 (2000bp); 5, IL-6 (2841bp); 6, IL-6 (4171bp); 7, IL-6 (4882bp)。

- 本产品扩增获得的PCR产物带有3'-dA overhangs的粘性末端，可直接用于和T载体连接进行TA克隆。
- 本产品如果用于20微升的PCR反应体系，两种包装的本产品分别足够用于100个和500个反应。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7284S-1	Easy-Load™ one-step genotyping blood PCR Mix (2X)	1ml
D7284S-2	Control primer mix (10 $\mu$ M each)	25 $\mu$ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7284M-1	Easy-Load™ one-step genotyping blood PCR Mix (2X)	1ml $\times$ 5
D7284M-2	Control primer mix (10 $\mu$ M each)	125 $\mu$ l
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存。适当避免反复冻融。

#### 注意事项：

- 由于PCR反应非常灵敏，在使用一步法鼠基因型鉴定试剂盒时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- 抗凝血的推荐用量为PCR体系总体积的5%左右，可以直接添加到PCR体系中，无需进行任何额外处理。
- PCR反应结束之后，建议3000-5000g离心3-5min以沉淀血细胞碎片，便于吸取上清用于电泳分析等。注意：由于抗凝血本身的原因，PCR结束后在PCR管底部会出现透明凝胶状物质，此为正常现象。
- 需自备Nuclease-Free Water。推荐选购碧云天生产的ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. PCR反应体系的设置：

- 融解并混匀Easy-Load™ one-step genotyping blood PCR Mix (2X)和Control primer mix (10 $\mu$ M each)，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上设置PCR反应体系：

试剂	20 $\mu$ l体系	50 $\mu$ l体系	终浓度
Nuclease-Free Water	9 $\mu$ l	22.5 $\mu$ l	-
Easy-Load™ one-step genotyping blood PCR Mix (2X)	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1X
引物混合物(10 $\mu$ M each)	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M each
抗凝全血	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	-
总体积	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-

### 注意:

- (a) 模板使用量: 作为PCR模板的抗凝血用量一般为PCR反应体系总体积的1-20%, 建议起始使用量为5%。对于高GC含量的PCR扩增, 可以尝试向PCR体系中加入终浓度1-10% (体积百分比)的DMSO。对于干血斑样品, 20 $\mu$ l和50 $\mu$ l的PCR体系中分别推荐使用约0.8平方毫米和2平方毫米的干血斑。
- (b) 引物浓度: 通常引物的终浓度为0.5 $\mu$ M时可获得良好的检测效果, 也可以根据情况在0.1-1.0 $\mu$ M范围内调整引物的终浓度。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度。
- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。
- d. 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖, 则在管内滴入一滴矿物油(ST275 Mineral oil (矿物油))。
- e. 把设置好的PCR反应体系置于PCR仪上, 开始PCR反应。

### 2. PCR反应参数的设置可以参考如下表格:

步骤	循环数	温度	时间	说明
1	-	94°C	5min	起始变性
2	30-40	94°C	30sec	变性
		55°C	30sec	退火
		68°C	2min/kb	延伸
3	-	68°C	10min	最终延伸
4	-	4°C	长时间保持	临时存放

### 注意:

- a. 起始变性(94°C, 5min)可以使白细胞裂解, 释放出可用于PCR扩增的基因组DNA。
- b. 需根据每次反应的模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等适当优化PCR反应条件, 包括温度、时间和循环数等。
- c. 对于初次进行的PCR, 为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物, 可以把循环数设置为35。

### 常见问题:

#### 1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- a. 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计, 注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中, 一定要注意加入酶切位点后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下, 可以考虑更换引物。
- b. 待扩增片段GC含量偏高。向PCR体系中加入适合扩增高GC含量DNA片段的试剂, 并相应地根据其要求或说明调整PCR反应参数的设置。
- c. 目的片段过长。尽管HemoTaq™ DNA Polymerase可以扩增最长达5kb的DNA片段, 但大多数时候更适合扩增2-3kb以下的片段。对于过长的目的片段的扩增, 需要适当优化引物和PCR反应参数。
- d. 引物的二级结构、引物二聚体或引物偏短会导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火, 通常采用从65°C逐步缓慢降温到55°C或50°C的方法, 使退火更加充分。
- e. 退火温度不佳, 需要优化。如果有温度梯度PCR仪, 则可以设置退火的温度梯度, 摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪, 则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- f. 延伸时间不足。可按照每1kb片段延伸2分钟进行设置, 对于较难扩增的片段可以设置为每1kb片段延伸3-4分钟。
- g. 在不同PCR仪上进行PCR反应, 避免有时PCR仪出现问题。
- h. 循环数不足, 适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40, 常用的循环数范围为30-40。
- i. 模板用量偏少, 可以在耐血体积范围内适当加大样品用量, 或采用巢式PCR (nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物, 然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 这样一方面可以起到扩增作用, 同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 可以起到扩增作用, 但不能去除非特异性条带。
- j. 对PCR引物进行脱盐甚至PAGE胶或HPLC纯化。
- k. 当产生较多非特异性条带时, 可以适当提高退火温度。

- l. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会对于实验结果的判断有很大帮助。

#### 2. 杂带较多或条带弥散

- a. 退火温度提高2-5°C。
- b. 减少抗凝全血的用量。
- c. 在室温配制PCR体系容易产生非特异性条带。推荐在冰浴上配制PCR反应体系。
- d. 如果模板的GC含量过高, 需要考虑加入适合扩增高GC含量DNA片段的试剂。
- e. 适当缩短延伸时间。

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7205	Taq DNA Polymerase	200U

D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7211S	Hot-Start Taq DNA Polymerase	200U
D7211M	Hot-Start Taq DNA Polymerase	1000U
D7211L	Hot-Start Taq DNA Polymerase	5000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7222	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	200U
D7222B	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7241S	HemoTaq™ DNA Polymerase (Blood-resistant)	200次
D7241M	HemoTaq™ DNA Polymerase (Blood-resistant)	1000次
D7243S	HemoTaq™ HF DNA Polymerase (Blood-resistant)	200次
D7243M	HemoTaq™ HF DNA Polymerase (Blood-resistant)	1000次
D7245	Blood PCR Enhancer (2X)	2ml
D7248S	PlantTaq™ DNA Polymerase (Chlorophyll-resistant)	200次
D7248M	PlantTaq™ DNA Polymerase (Chlorophyll-resistant)	1000次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	100/400/2000/10000次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	100/400/2000/10000次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	100/400/2000/10000次
D7281S	动物组织直接PCR试剂盒	100次
D7281M	动物组织直接PCR试剂盒	500次
D7283S	鼠尾基因型快速鉴定试剂盒	100次
D7283M	鼠尾基因型快速鉴定试剂盒	500次
D7284S	一步法鼠基因型鉴定试剂盒	100次
D7284M	一步法鼠基因型鉴定试剂盒	500次
D7285S	Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (2X)	100次
D7285M	Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (2X)	500次
D7287S	Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (HF, 2X)	100次
D7287M	Easy-Load™ Blood Direct PCR Master Mix (HF, 2X)	500次
D7289S	Easy-Load™ Plant Direct PCR Master Mix (2X)	100次
D7289M	Easy-Load™ Plant Direct PCR Master Mix (2X)	500次
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250µl
FTUB322	BeyoGold™ PCR管 (0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包
FTUB323	BeyoGold™ PCR管 (0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包,10包/箱
FTUB328	BeyoGold™ PCR八联排管 (0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒
FTUB329	BeyoGold™ PCR八联排管 (0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒,10盒/箱
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml

Version 2019.05.18