

One Step Mouse Genotyping Kit

一步法小鼠基因型鉴定试剂盒

PM102

Version 23.1.1

ATG

产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介.....	1
产品特点.....	1
产品组成.....	1
产品应用.....	1
储存条件.....	1
实验方案.....	2
常见问题与解决方案.....	3

产品简介

本试剂盒包含 DNA 粗提和 PCR 扩增体系，适用于小鼠基因型快速鉴定 (Rapid Genotyping)。本试剂盒可用于从小鼠耳朵、尾巴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，无需匀浆、破碎、过夜消化、酚氯仿抽提、DNA 沉淀或柱式纯化等操作，极大缩短了实验耗时。使用时，将组织浸泡在预添加了 Proteinase K 的裂解液中，55°C 孵育 20 min 后 95°C 加热 5 min 灭活 Proteinase K。裂解产物经离心后可直接用做 PCR 扩增模板，且经过测试优化验证，广泛适用于 2 kb 以内目标片段扩增，并适用于四重以内的多重 PCR 检测。

试剂盒中配有 2 × MG Taq Master Mix (Dye)，包含最新升级版的热启动 Taq 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，减少了开管/移液等操作，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。独特的保护剂使得 Taq DNA Polymerase 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。体系中预混有电泳缓冲液和 DNA Loading Buffer，可在反应结束后直接进行电泳，使用方便快捷。PCR 产物的 3'端带 A，可克隆至 T 载体。

产品特点

操作简便

扩增高效

产品组成

组分	PM102 (200 rxns)
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	40 ml
Proteinase K	800 μl
2 × MG Taq Master Mix (Dye)	5 × 1 ml
MgCl ₂ (25 mM)	500 μl
5 × PCR Enhancer	2 × 1 ml

产品应用

小鼠基因分型

小鼠转基因检测

小鼠基因敲除分析

储存条件

1 × Mouse tissue Lysis Buffer 于 4 °C 保存；其余组分 -20 °C 保存。▲避免反复冻融。

注意事项

1. 用 70% 的乙醇 (自备) 预先清洗组织分离过程中所使用的所有工具；
2. Proteinase K 灭活步骤 (95°C, 5 min) 必须进行，否则其残留活性会抑制后续 PCR 反应；
3. PCR 反应体系配制过程应于冰水浴中进行，以提高扩增特异性。

实验方案

DNA 提取

推荐组织使用量：

1 ~ 3 mm 小鼠尾尖 ；

2 ~ 5 mm² 小鼠耳朵；

1 ~ 2 个小鼠脚趾。

1. 根据需要裂解的样品数量，配制适量 1 × 裂解液，单个样品所需裂解液配制方法如下：

组分	用量
Proteinase K	4 μl
1 × Mouse tissue Lysis Buffer	200 μl

▲应使用新鲜配制的 1 × 裂解液；各组分添加完成后请涡旋震荡，充分混匀后再使用。

2. 取 200 μl 的 1 × 裂解液加入到所需裂解的组织中，涡旋震荡后在 55°C 水浴中孵育 20 min。对于常规大小目标片段，20 min 孵育已足以释放足量的 DNA 模板，孵育时间也可根据实际情况进行调整。

下表为不同长度的扩增片段在 55°C 下所推荐的孵育时间：

扩增片段长度	55°C 推荐孵育时间
~ 500 bp	10 min
~ 1000 bp	20 min
~ 1500 bp	30 min

▲为保证 DNA 释放效率，请务必将组织全部浸没至裂解液中。孵育结束后组织块可能并未消化完全，属正常情况，不影响使用。

3. 孵育完成后，将样品置于 95°C 或者沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K。

4. 将裂解产物涡旋震荡充分混匀后，12,000 rpm 离心 5 min，取上清即可进行 PCR 反应。也可将上清转移至另一个灭菌 EP 管中，-20°C 可存放至少三个月。

PCR 扩增

1. 2 × MG Taq Master Mix (Dye) 完全解冻后，上下颠倒混匀。于冰上配制如下反应体系：

组分	用量
2 × MG Taq Master Mix (Dye)	25 μl
Primer 1 (10 μM)	2 μl
Primer 2 (10 μM)	2 μl
裂解产物	2 ~ 5 μl
ddH ₂ O	to 50 μl

a. 2 × MG Taq Master Mix (Dye) 中预混有终浓度 1.5 mM 的 Mg²⁺。在实际使用时，可使用试剂盒提供的 MgCl₂ (25 mM) 进行调整，调整间隔为每次增加 0.5 mM。

b. 裂解产物加入量不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

2. 推荐 PCR 反应程序设置

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	95°C	5 min	Stage 1	Reps: 1
变性	95°C	30 sec	Stage 2	Reps: 30 ~ 35
退火	55°C*	30 sec		
延伸	72°C	60 sec/kb		
充分延伸	72°C	7 min	Stage 3	Reps: 1

*退火温度需要根据引物 T_m 值进行调整，一般设置成低于引物 T_m 值 1-2°C 即可。

3. 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测，无需添加 DNA Loading Buffer。

常见问题与解决方案

扩增产量低或者无法扩增

- ① 组织中的 PCR 抑制物混入裂解液中：可尝试将裂解产物稀释 10 倍后再进行 PCR 扩增；
- ② DNA 释放效率较差：可尝试延长 55°C 孵育时间至 3 h；
- ③ Proteinase K 没有充分灭活：灭活步骤在沸水浴中进行；
- ④ PCR 循环数不够：一般而言，30 ~ 35 个循环已经足以扩增足量的产物。然而对于某些片段，提高循环数可以获得更好的扩增效果；
- ⑤ 扩增反应退火温度设置太高：降低退火温度（每次降低 3°C）；
- ⑥ PCR 引物错误：设置以纯化过的小鼠基因组为模板的阳性对照反应。

非特异性产物很多

- ① PCR 反应体系在室温下配制：在冰水浴中配制反应体系可显著降低非特异性扩增；
- ② 扩增反应退火温度设置太低：提高退火温度（每次提高 2°C）；
- ③ PCR 引物错配严重：重新设计引物。

阴性对照也出现扩增

PCR 反应体系出现污染：逐个更换组织裂解体系、PCR 扩增体系中的每一个组分。



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室