

## 动物组织 Direct PCR 试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒包括样品裂解试剂和 PCR 试剂两部分。

动物组织使用样品裂解试剂处理后, 可作为模板直接使用 PCR 试剂进行扩增, 扩增产物可直接电泳。

PCR 试剂适合 3 对引物多重 PCR, 非常适合动物基因分型。

### 二、试剂盒组成和储存

目录号	规格	组成成分	储存条件	
PT104-01	100 次	包装 A/盒	Buffer DR1 10 ml	室温
		(样品裂解试剂)	Buffer DR2 0.2 ml	
		包装 B/袋	2×DR PCR Master Mix* 1 ml	-20°C
		(PCR 试剂)	diH <sub>2</sub> O 1 ml	
PT104-02	500 次	包装 A/盒	Buffer DR1 50 ml	室温
		(样品裂解试剂)	Buffer DR2 1 ml	
		包装 B/袋	2×DR PCR Master Mix* 1 ml×5	-20°C
		(PCR 试剂)	diH <sub>2</sub> O 1 ml×5	

\* -20°C 长期保存; 反复冻融 16 次不影响使用效果; 如果频繁使用, 建议储存于 2-8°C。

### 三、样品裂解

#### 方法一: 使用 PCR 仪

1. 在 PCR 管中加入 **98 µl Buffer DR1** 和 **2 µl Buffer DR2**, 吹打 2 次混合均匀。

如处理多个样品, 可事先将 Buffer DR1 和 Buffer DR2 按比例预混; 两者混合后需 1 小时内使用完。

2. 加入 1-5 mg 动物组织: 约 0.5-2 mm 鼠尾尖或脚趾, 1-5 个毛囊。

3. 置于 PCR 仪, 65°C 10 min, 95°C 3 min。

反应结束后, 裂解液可直接作为模板进行 PCR; 2-8 °C 可放置 2 周, 或 -20 °C 长期保存。

#### 方法二: 使用水浴或金属浴

1. 在 0.5-1.5 ml 离心管中加入 **98 µl Buffer DR1** 和 **2 µl Buffer DR2**, 吹打 2 次混合均匀。

如处理多个样品, 可事先将 Buffer DR1 和 Buffer DR2 按比例预混; 两者混合后需 1 小时内使用完。

2. 加入 1-5 mg 动物组织: 约 0.5-2 mm 鼠尾尖或脚趾, 1-5 个毛囊。

3. 室温放置 30 min 或 65°C 10 min, 95°C 3 min。

反应结束后, 裂解液可直接作为模板进行 PCR; 2-8 °C 可放置 2 周, 或 -20 °C 长期保存。

## 四、PCR

### 1. PCR成分准备

将2×DR PCR Master Mix和引物室温解冻，置于冰上。Mix解冻后需上下翻转混合均匀。

### 2. 配制PCR反应液

在冰上将以下各成分加入PCR反应管：

模板DNA（样品裂解液）	1-2 $\mu$ l
Primer1 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
Primer2 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
Primer 3-6 最多3对引物	
2×DR PCR Master Mix	10 $\mu$ l
diH <sub>2</sub> O	补充至20 $\mu$ l

注意：尽可能使用合适精确度的加样器，并且避免加样体积小于1  $\mu$ l (可按适当比例稀释后加样)。为保证样品之间的均一性，能预混的成分尽可能预混后分装。

3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀，简短离心。

### 4. PCR反应循环设置举例

预变性	95°C	3-5 min	
变性	94°C	30 sec	} 25-35 cycles*
退火	40-72°C*	30 sec	
延伸	72°C	0.5-1 kb/min*	
72°C	2 min		
4-10°C	soak		

#### \*退火温度

初次使用一对引物时可尝试低于T<sub>m</sub> 5°C作为退火温度(如果两条引物T<sub>m</sub>不同，参考较低的T<sub>m</sub>)。

使用oligo软件计算引物的T<sub>d</sub>值，以低于T<sub>d</sub>值4°C作为退火温度。T<sub>d</sub>值的计算方法考虑了引物邻近碱基组成和引物3'末端与模板配对的稳定性，因此更具有参考意义。

退火温度偏高不利于引物与模板的结合，会降低PCR效率。退火温度偏低，会增加引物之间、引物与模板的非特异性结合，降低了引物与模板特异性结合的概率，从而降低了PCR效率，最不利的情况是产生大量引物二聚体和非特异性扩增。

最佳退火温度需要进行梯度PCR确定。

如果最佳退火温度为68°C-78°C，可以省略延伸步骤，即合并退火和延伸步骤。

#### \*循环数

循环数过多可能会减少目的产物。PCR过程中不完全延伸和高温断裂，会缓慢积累随机3'末端。产生大量PCR产物后，引物被大量消耗，PCR产物3'末端和随机3'末端与变性模板的非特异性结合相对占优势，出现了随机扩增；dNTP大量消耗导致游离Mg<sup>2+</sup>浓度增高，也加剧了随机扩增。随机扩增产物电泳为涂抹带，随着循环数的增加随机扩增产物长度会不断延长，甚至电泳时积累在加样孔，而目的PCR产物会逐渐减少，甚至消失。

循环数过多会产生大量气溶胶，可能会污染同次PCR其他反应管，造成假阳性。例如单独做空白对照无目的产物，而与阳性样品平行PCR时，空白对照出现了目的产物。

摸索最佳循环数：配制大体积PCR体系，分装到3-5个PCR反应管，使用较低的循环数取出一管(例如，25个循环)，预变性时间设为10秒，再进行3-5个循环，以此类推，最后平行电泳。

#### \*延伸

延伸温度通常为72°C，延伸时间以1 kb/min计算，时间过长可能会增加非特异性扩增。延伸时间过短，相对有利于引物二聚体的扩增。

如进行多重PCR，延伸时间以0.5 kb/min计算。