

高效能鼠尾鉴定试剂盒使用说明

High-performance mouse genotyping kit

产品简介

本试剂盒专用于长片段 (10 kb 内) 和复杂序列的小鼠基因型的快速鉴定, 并具有微量, 快捷与精准三大特点。使用时, 仅需 1-2mm 小鼠尾部组织或脚趾的微量样本, 15 分钟快速裂解, 一步获取足量的 DNA 模板直接用于 PCR 鉴定, 无需抽提与纯化 DNA, 大大降低了实验成本与难度。

同时其中配套的 MG-LA Mix 经过数百次优化与验证, 不但对未提纯的 DNA 模板中的 PCR 抑制成分具有超强的耐受性, 而且扩增效率极强 (扩增速度可快至 5 sec/kb), 有效实现 10kb 以内片段的快速精准扩增, 这在市面上几乎很少有 PCR 酶可以实现。另外 MG-LA Mix 中含有 loading dye, PCR 后可直接跑凝胶电泳, 更加省时便捷。

试剂盒组成

组分	YK-MGH-50	YK-MGH-100	YK-MGH-250	储存温度
HpTail Lysis	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	常温
MG-LA Mix (+Dye)	625 μ L	1.25 mL	3.125 mL	-20°C
TailAmp Ctrl	100 μ L	200 μ L	500 μ L	-20°C
GC Buffer	250 μ L	500 μ L	1.25 mL	-20°C

*试剂有效期为12个月, 请注意试剂保存温度, HpTail Lysis开封后请按指示在室温存放。

*GC Buffer 可用于高 GC 特征序列的扩增, 25 μ L 的体系中加 5 μ L。

实验前准备

镊子, 手术剪

1.5 mL EP 管

PCR 8 联管/96 孔 PCR 板

单道移液器/多道移液器

PCR 扩增仪



电话: 400-688-9033

网址: www.ubigene.com

地址: 广州市黄埔区开源大道198号中巨华夏科技园四楼

美国办事处: 855 777 3210

欧洲办事处: 800 3272 9252

亚太联系方式: 001 800 3272 9252

恒温金属浴

小型高速离心机

■ 鼠尾鉴定操作图示



■ 鼠尾裂解释放 DNA

散管操作

- ① 准备好镊子和手术剪，75%的乙醇喷洗消毒。
- ② 剪取 1-2 mm 鼠尾，用镊子夹到 1.5 mL EP 管中，加 50-100 μ L HpTail Lysis，裂解液需没过鼠尾。
- ③ 将 EP 管放到 95°C 金属浴中，孵育 15 min-30 min。

注意：若样品为脚趾，孵育时间建议设置为 30 min。

- ④ 把上清液移至 8 联管或者 96 孔 PCR 板中存放，样品可直接进行 PCR 实验，若暂时不使用，可保存在-20 冰箱中。

96 孔板高通量操作

- ① 准备好镊子和手术剪，75%的乙醇喷洗消毒。
- ② 剪取 1-2 mm 鼠尾，用镊子夹到 96 孔 PCR 板，加 50-100 μ L HpTail Lysis，裂解液需没过鼠尾。
- ③ 将 96 孔 PCR 板放到 PCR 仪中，95°C，孵育 15 min-30 min。

注意：若样品为脚趾，孵育时间建议设置为 30 min。

- ④ 把上清液移至新的 96 孔 PCR 板中存放，样品可直接进行 PCR 实验，若暂时不使用，可保存在-20 冰箱中。



电话:400-688-9033

网址:www.ubigene.com

地址:广州市黄埔区开源大道198号中巨华夏科技园四楼

美国办事处:855 777 3210

欧洲办事处:800 3272 9252

亚太联系方式:001 800 3272 9252

■ PCR 鉴定

将 MG-LA Mix (+Dye) 和 TailAmp Ctrl 从 -20°C 冰箱取出，放置在冰盒中融解，按照下表配制 PCR 体系：

表 1. 实验样品配制体系

试剂	体积 (每反应)
MG-LA Mix (+Dye) , 2x	12.5 μ L
鼠尾裂解产物	1 μ L
鉴定引物 F (10 μ M)	1 μ L
鉴定引物 R (10 μ M)	1 μ L
ddH ₂ O	9.5 μ L
总体积	25 μ L

表 2. PCR 对照配制体系

试剂	体积 (每反应)
MG-LA Mix (+Dye) , 2x	12.5 μ L
鼠尾裂解产物	1 μ L
TailAmp Ctrl	2 μ L
ddH ₂ O	9.5 μ L
总体积	25 μ L

注：鉴定引物需根据基因编辑靶位点的位置和敲除大小进行设计，PCR 对照体系扩增出来的条带大小约为 323 bp。



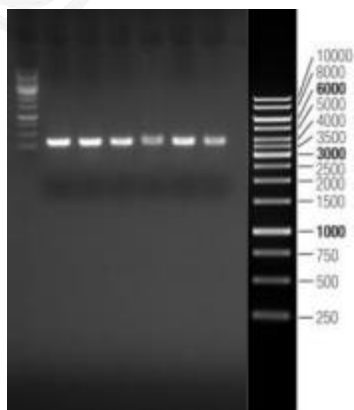
PCR 反应程序如下表:

表 3. PCR 鉴定程序

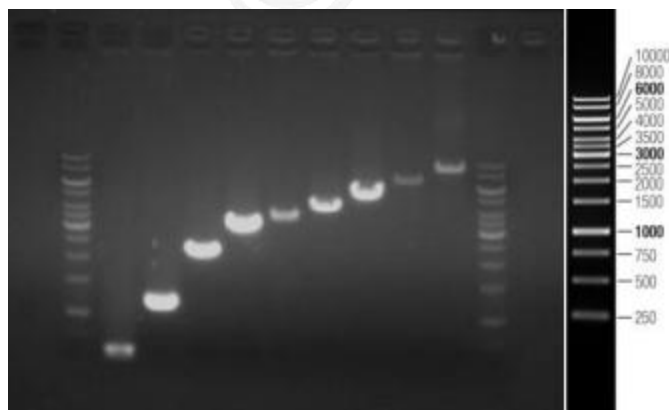
步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	3 min	1 cycle
循环扩增	95°C	15 s	35~40 cycles
	60°C	15 s	
	72°C	7 sec/kb	
延伸补偿	72°C	5 min	1 cycle

PCR 产物可直接点样跑琼脂糖凝胶 (不需加 Loading Buffer) , 或者送 Sanger测序。

实验案例



(图 1)



(图 2)

图 1 是用 TailAmp Ctrl 引物按表 2 体系对鼠尾裂解液进行扩增后, 取 5 μ L 进行电泳的结果。图 2 是对不同长度模板进行鉴定的结果, 取 5 μ L 进行电泳, 目的条带大小分别为 500 bp, 1000 bp, 2000 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6500 bp, 8500 bp。胶图中的扩增条带明亮且单一, 说明本产品可用于大于 8kb 的 DNA 片段模板的快速扩增。



常见问题

① 鼠尾没有裂解完，是否会有影响？

裂解 15 min 后鼠尾还有未裂解完部分，但此时已裂解的样品释放出足够的基因组 DNA 可供后续实验了。若样品为脚趾这类带有较硬难消化的组织，可把时间延长至 30 min。

② PCR 产物少或没有目的条带？

a) 裂解后没有转移上清弃沉淀，裂解液中的杂质抑制了 PCR 反应。

b) 裂解液中的 DNA 含量太多或较少，可通过稀释裂解液模板或者增加上样体积解决。

c) 引物设计问题。引物与模板不匹配，或者设计时没有注意引物的 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。

d) 扩增序列 GC 含量偏高。在 PCR 体系中添加 GC Buffer 或者 DMSO 等变性剂，帮助打开模板链，降低 PCR 扩增难度。

③ 可以使用其他的 PCR 酶进行鉴定吗？

本试剂盒 HpTail Lysis 处理后的样品为粗提核酸样品，便于进行微量细胞的基因组提取和高通量操作，但由于未经过纯化，不能兼容所有的 PCR 试剂，推荐配套的鉴定试剂。

④ TailAmp Ctrl 的作用是什么？

做 PCR 的阳性对照，确定 PCR 体系配制和操作是否有问题。若扩增不出条带，说明裂解操作或者 PCR 操作是有问题的，需要逐一做排查。若扩增出了条带，说明是扩增目的基因的引物或者是要鉴定的目的基因区域的序列问题。

⑤ 可以扩增长多大的片段？

本试剂盒可扩增长达 10 kb 左右的片段，且上机时间极短，1.5 h 就可获得 10 kb 的长片段 PCR 产物。

