

# 细胞和组织 PCR 试剂盒 Plus（免核酸提取）

## Nu-C01

### 试剂盒应用

本试剂盒可用于动物组织或细胞 DNA 的克隆、重组细胞株鉴定、DNA 病毒鉴定、STR 鉴定等。TC-DNA-Lysis 采用专利配方，10 分钟内裂解各种细胞和组织。使用过程中无需大体积样本、无需反复离心，从而获得高质量的 DNA 模板。经过验证，该试剂盒可以对单个细胞或 10 个病毒粒子进行检测。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

### 试剂盒组成

组分	Nu-C0101 (50T)	Nu-C0102 (250T)
TC-DNA-Lysis	1 mL	5 mL
2×Master TaqMix(With Dye)	500 μL	2×1.25 mL

### 保存条件

-20° C 保存。

使用前将 TC-DNA-Lysis 室温充分混匀，长期使用可 4° C 保存。

2×TaqMix(With Dye)溶解后需置于冰上，避免反复冻融。

### 需要准备

金属恒温浴、离心机、PCR 仪

### 使用方法

#### 一、不同样品的处理方法

##### 1. 组织液的处理

- (1) 组织液包括组织研磨液、细胞悬液等。取 10 μL 组织液置于离心管中。
- (2) 加入 20 μL TC-DNA-Lysis。
- (3) 充分混匀。
- (4) 置于 55° C 作用 5 分钟，然后 95° C 作用 5min。溶液即为 DNA 模板。

##### 2. 组织块的处理

- (1) 用眼科剪剪取 1-2mm 的组织块，并将组织块剪成肉泥状。
- (2) 加入 20 μL TC-DNA-Lysis。
- (3) 充分混匀。
- (4) 置于 55° C 作用 5 分钟，然后 95° C 作用 5min。
- (5) 10,000 转离心 60 秒取上清。上清即为 DNA 模板。

### 3. 在 DNase free 的离心管中配制 PCR 反应体系

	20 $\mu$ L 体系 (推荐)	50 $\mu$ L 体系
2 $\times$ Master TaqMix(With Dye)	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
引物 1 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L
引物 2 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L
DNA 模板	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L	19 $\mu$ L

### 4. 按照以下方法设定 PCR 反应

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15-30 s	35-40
退火	50~72 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	1 kb/min	
彻底延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	1

## 注意事项

### 一、试剂盒使用前注意事项

- (1) 所有试剂应按照指定温度储存。请勿反复冻融。
- (2) 使用前均需要对操作区进行消毒，消毒方式可以采用 75%乙醇或核酸消除剂等。耗材均需使用商品化的无酶耗材。
- (3) TC-DNA-Lysis 采用专利配方，若出现肉眼可见小球状物质属于正常现象。
- (4) TC-DNA-Lysis 频繁使用，可在 4 $^{\circ}$ C 保存。长期不使用可放 -20 $^{\circ}$ C 保存。

### 二、样本注意事项

- (1) 细胞在含/不含血清的环境中均可直接使用试剂盒。
- (2) 扩增 2kb 以内片段，细胞样品浓度不超过 1000 个细胞。如若扩增片段超过 2kb，可适当提高细胞浓度。
- (3) 不同组织使用不同的眼科剪和眼科镊进行处理，防止交叉污染导致检测结果偏差。

### 三、试剂盒使用过程中注意事项

- (1) PCR 过程中推荐使用阴性对照和阳性对照。
- (2) 整个过程中使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。
- (3) 2 $\times$ Master TaqMix(With Dye)已包含染料，可在反应结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳。
- (4) PCR 产物 3'末端含有 A，可直接进行 TA 克隆。

### 四、试剂盒使用后注意事项

- (1) TC-DNA-Lysis 处理后的 DNA 模板可在 -20 $^{\circ}$ C 保存至少 1 个月。避免反复冻融，防止基因组断裂。
- (2) PCR 反应完成后，严禁在实验区开盖。应在污染区进行琼脂糖凝胶电泳，防止气溶胶污染。
- (3) 为防止试剂盒污染，请勿将不同批号试剂盒混用。

## 检测实例

来源	范围
细胞	293T、A549、Vero、PK15、Sp2/0、HCT-116、Marc145、ST、siHa、MCF-7
人	头发、唾液、咽拭子、指甲
小鼠	心、肝、脾、肺、肾、脑、脊柱、胃、大肠、小肠、胆囊、尾巴、脚趾、皮、耳朵、肌肉
猪	心、肝、脾、肺
鸡	心、肝、脾、肺、胃
亚洲鲫鱼	鱼鳍、鱼泡

## 常见问题解析

问题	可能原因	推荐解决方案
阳性对照和样本都未出现扩增条带	(1) PCR 条件并非最优 (2) 2×Master TaqMix(With Dye)保存不当 (3) 引物并非最优	(1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。 (2) 2×Master TaqMix(With Dye)应在-20℃保存，使用时放冰浴保存。避免反复冻融。
阳性对照有条带，但是样本无条带或者条带比较弱	(1) PCR 条件并非最优 (2) 提取 DNA 模板上样量太大 (3) 基因组断裂或者降解 (4) 模板量不合适 (5) PCR 循环数不合适 (6) 细胞数量过多 (7) 组织块过大 (8) 扩增片段太大	(1) 推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件，包括退火温度、引物浓度等。 (2) 增大 PCR 反应体系，过多使用模板 DNA 会导致扩增效率下降，推荐使用模板量为 0.5-2μL。 (3) 推荐使用新鲜细胞或者组织样本进行裂解。 (4) 模板 DNA 可在-20℃保存至少 1 个月。后期需要重复检测，建议放-80℃保存。 (5) TC-DNA-Lysis 经过优化，可在 4℃保存 6 个月。无需反复冻融。 (6) 增加循环数，推荐使用 35-40 个循环，但是模板复杂，可适当增加 5 个循环。 (7) 推荐细胞数量为 1000 个细胞，细胞数量偏大，可适当增加 TC-DNA-Lysis 使用量。 (8) 推荐组织块大小为 1mm <sup>3</sup> ，可适当减小组织块大小或者增加 TC-DNA-Lysis 使用量。 (9) 推荐扩增 5kb 以内基因。
非特异性条带多	(1) 退火温度偏低 (2) PCR 循环数过多 (3) 引物浓度过高 (4) 引物并非最优	(1) 推荐使用梯度 PCR 对退火温度进行摸索。 (2) 推荐使用 35-40 个循环进行扩增。 (3) 适当调低引物浓度，使引物终浓度在 0.1-0.5μM。 (4) 重新设计引物。
阴性对照出现条带	(1) 引物污染 (2) 无菌水污染 (3) 操作工具污染 (4) 样本间交叉污染 (5) PCR 产物间污染	(1) 使用耗材需要经过无酶处理。 (2) 使用移液器时防止液体飞溅。 (3) 引物分装成小份取用。 (4) 减少开盖次数，防止气溶胶污染。 (5) 使用的吸头、离心管等耗材应丢弃在含有 75%乙醇或核酸消除剂的容器中，防止形成环境污染。 (6) 定期对样本处理区域进行消毒。