# 小鼠组织 PCR 试剂盒 Plus（免核酸提取）

# Nu-M01

## 试剂盒应用

本试剂盒适用于小鼠基因克隆，转基因小鼠、基因敲除小鼠的快速 PCR 鉴定。

Mu-DNA 采用的升级配方，5 分钟内裂解鼠尾、耳朵、脚趾。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。

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-M0101（50T）** | **Nu-M0102（250T）** |
|---|---|---|
| Mu-DNA | 1 mL | 5 mL |
| 2× EZ TaqMix(With Dye) | 1 mL | 5×1 mL |

## 保存条件

-20º C 保存。

使用前将 Mu-DNA 室温充分混匀，经常使用可 4℃保存。

2×EZ 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

1. 样品处理
   （1）用眼科剪剪取 1-2mm 的鼠尾、耳朵、脚趾。
   （2）加入 20 μL Mu-DNA。
   （3）充分混匀。
   （4）置于 55℃作用 5 分钟。
   （5）10,000 转离心 60 秒取上清。上清即为 DNA 模板。

2. 在 DNase free 的离心管中配制如下反应体系

| | **20 μL 体系** |
|---|---|
| 2×EZ TaqMix(With Dye) | 10 μL |
| 引物 1 (10 μM) | 1 μL |
| 引物 2 (10 μM) | 1 μL |
| DNA 模板 | 1 μL |
| ddH2O | 7 μL |

3. 按照以下方法设定 PCR 反应

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---|---|---|---|
| 预变性 | 95 ºC | 5 min | 1 |
| 变性 | 95 ºC | 15-30 s | 35-40 |
| 退火 | 50~72 ºC | 30 s | |
| 延伸 | 72 ºC | 1 kb/min | |
| 彻底延伸 | 72 ºC | 5 min | 1 |
| | 4 ºC | 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）使用前后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）Mu-DNA 频繁使用，可在 4℃保存。长期不使用可放-20℃保存。

**二、样本注意事项**

（1）不同组织使用不同的眼科剪进行处理，防止交叉污染导致检测结果偏差。

（2）组织剪取量不宜过大。

**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×EZ TaqMix(With Dye)包含染料，可在反应结束后直接进行琼脂糖凝胶电泳。

**四、试剂盒使用后注意事项**

（1）Mu-DNA 处理后的 DNA 模板可在-20℃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。

**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<br>（2）2×EZ TaqMix(With Dye)保存不当<br>（3）引物并非最优 | （1）推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。<br>（2）2×EZ 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<br>（2）DNA 模板量太大<br>（3）基因组断裂或者降解<br>（4）PCR 循环数不合适<br>（5）组织块过大<br>（6）扩增片段太大<br>（7）引物浓度不合适 | （1）推荐使用梯度 PCR 摸索最佳 PCR 反应条件。<br>（2）增大 PCR 反应体系，过多使用 DNA 模板会导致扩增效率下降，推荐使用模板量为 0.5-2μL。<br>（3）提取基因组 DNA 可在-20℃保存至少 1 个月。<br>（4）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。<br>（5）推荐组织块大小为 $1mm^3$，组织块过大可适当减小或者增加 Mu-DNA 用量。<br>（6）推荐扩增 5kb 以内基因。 |
| 非特异性条带多 | （1）退火温度偏低<br>（2）PCR 循环数过多<br>（3）引物浓度过高<br>（4）引物并非最优 | （1）推荐使用梯度 PCR 对退火温度进行摸索。<br>（2）推荐使用 35-40 个循环进行扩增。<br>（3）适当调低引物浓度，使引物终浓度在 0.1-0.5μM。<br>（4）重新设计引物。 |
| 阴性对照出现条带 | （1）引物污染<br>（2）无菌水污染<br>（3）操作工具污染<br>（4）样本间交叉污染<br>（5）PCR 产物间污染 | （1）使用耗材需要进过无酶处理。<br>（2）使用移液器时防止液体飞溅。<br>（3）减少开盖次数，防止气溶胶污染。<br>（4）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。<br>（5）定期对样本处理区域进行消毒。 |