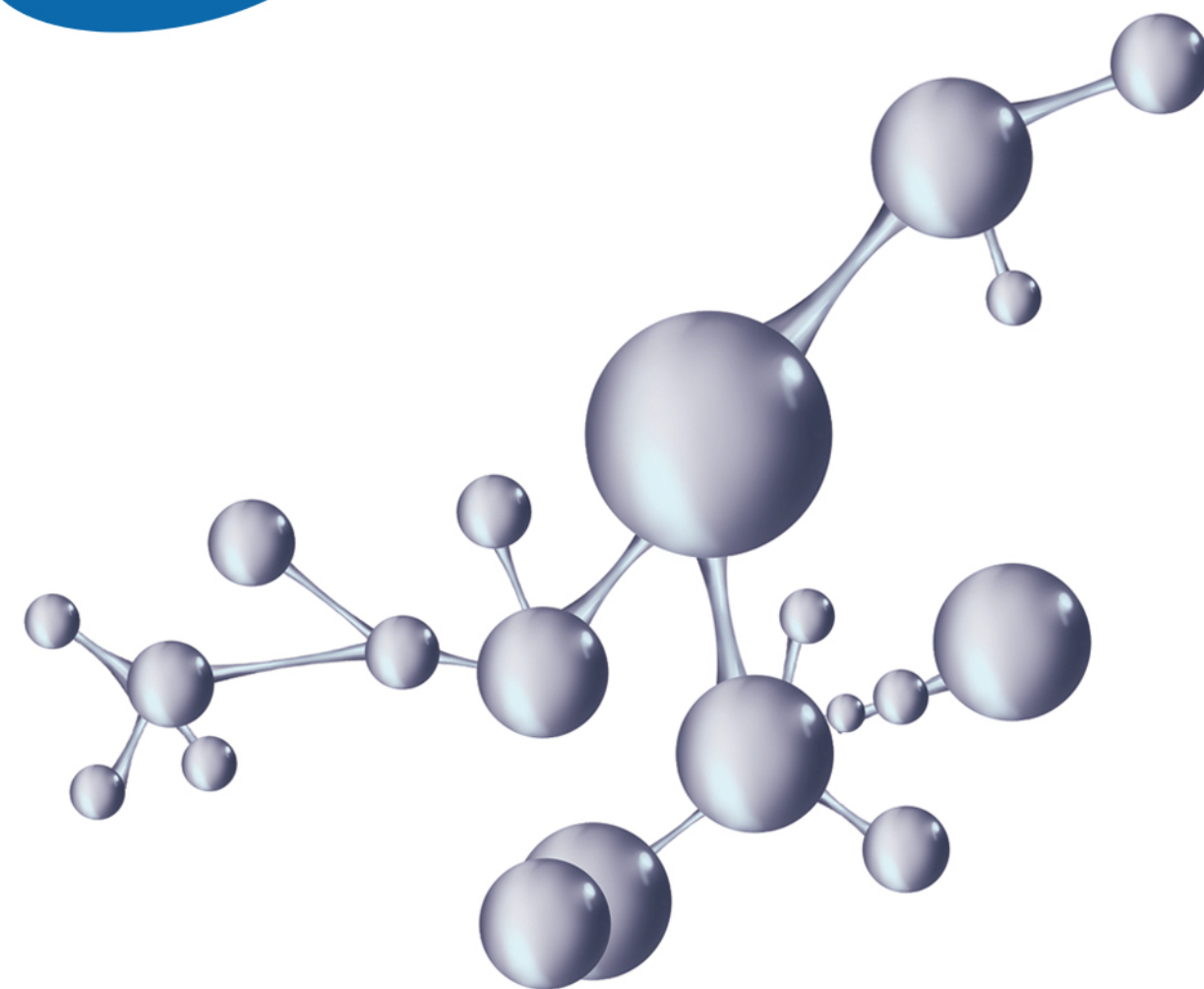




官方二维码

扫一扫 了解更多



HRK Mouse Genotyping Kit

使用说明书

☎ 010-69738937

🌐 www.huaruikang.com.cn

📍 北京市昌平区北清路1号院珠江摩尔大厦3号楼

www.huaruikang.com.cn

HRK Mouse Genotyping Kit

使用说明书

【目录号】

HRK-P2404-1 (100 rxns)

HRK-P2404-2 (500 rxns)

【产品内容】

试剂成分	100 反应	500 反应
HRK Lysis Buffer A	9 ml	45 ml
HRK Lysis Buffer B	1 ml	5 ml
2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix	1 ml	5 ml

【产品简介】

本试剂盒包含 DNA 粗提取以及 PCR 扩增体系，适用于小鼠基因型快速鉴定。本试剂盒可用于从小鼠尾巴、耳朵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。试剂盒中配有 2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix，包含经过抗体修饰的热稳定 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，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。PCR 产物带有 A 碱基的粘性末端，可直接进行 TA 克隆。

【产品特点】

- 超简操作：裂解产物直接作为模板进行 PCR 扩增鉴定。
- 超省时间：超强裂解液可 15 min 快速释放基因组 DNA。
- 高效扩增：2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix 经过蛋白工程改造，延伸速度为 30s/kb。
- 应用范围广泛：适用于多种小鼠组织（尾巴、耳朵以及脚趾等）的直接扩增。

【储存条件及有效期】

- HRK Lysis Buffer A 和 HRK Lysis Buffer B 于 2-8℃保存，≤0℃运输。
- 2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix 于-20℃±5℃保存，≤0℃运输。
- 试剂盒在正确储存条件下有效期为 18 个月。

【适用范围】

- ◇ 小鼠基因分型
- ◇ 小鼠转基因检测
- ◇ 小鼠基因敲除分析

【操作步骤】

◇ DNA 提取

推荐组织使用量：

- 小鼠尾尖 1-3mm ；
- 小鼠耳朵 2-5mm² ；
- 小鼠脚趾 1-2 个。

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：

	成分	体积
1×裂解液 (单样品)	HRK Lysis Buffer A	90 μl
	HRK Lysis Buffer B	10 μl

▲应使用新鲜配置的 1×裂解液;各组分添加完成后请涡旋振荡,充分混匀后再使用。

2. 取 100μl 1×裂解液加入到所需裂解的组织中，涡旋振荡后在 70℃水浴中孵育 15min。对于常规大小目标片段，15min 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：

扩增片段长度	70℃推荐孵育时间
约 500bp	10 min
约 1000bp	20 min
约 1500bp	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℃或者沸水浴中加热 5 min。
4. 将裂解产物涡旋振荡充分混匀后，12,000 rpm(13,400×g)离心 3 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℃可存放至少三个月。

◇ PCR 扩增

1. 2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix 解冻完全后，上下颠倒混匀。于冰上配制如下反应体系：

组分	50μl	20μl
DNA 模版 ^a	X μl	X μl
2×HRK Mouse Genotyping PCR Mix	25 μl	10 μl
正向引物 (10 μM) ^b	1 μl	0.5 μl
反向引物 (10 μM) ^b	1 μl	0.5 μl
5×Enhancer ^c	X μl	X μl
Sterile Water	补足至 50 μl	补足至 20 μl
总体积	50 μl	20 μl

a 通常 1-2μl 模板能得到较好的扩增结果，扩增模板不宜过多，可根据比例放大或缩小反应体系。

b 扩增片段 GC 含量<65%，不用添加 Enhancer；如果片段 GC 含量>65%，需要添加 Enhancer。
注：Enhancer (终浓度:0.4M 甜菜碱+ 5% DMSO)

c 推荐每条引物使用终浓度为 0.4μM，引物使用量太多会导致非特异性扩增增加。

2. PCR 反应循环的设置

流程	温度控制	时间	循环数
预变性	95℃	3 min	1
变性	95℃	15 s	35 ^f
退火	56-72℃ ^d	20 s ^e	
延伸	72℃	30s /kb ^g	
终延伸	72℃	5 min	1

d 根据引物 T_m 确定退火的温度，推荐通过建立温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度；退火温度直接决定扩增特异性，如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度。

e 常规模板退火时间 20s 左右，复杂模板(高 GC 和长片段)退火时间适当延长为 40s 左右。

f 一般而言，35 个循环已可以扩增足量产物。太多的循环将会导致非特异性扩增增加，且有可能会降低扩增保真度。

g 一般延伸时间为 30s/kb 即可，如发现扩增效率较低，可适当延长延伸时间至 60 s/kb。

3. 结果检测：取 5-10μl 反应液电泳观察结果，需添加 DNA Loading Buffer。

【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. 组织应尽量剪碎，以便裂解反应更顺利进行；
3. 建议使用新鲜采取的动物组织，若为长期冷冻组织，应尽量避免反复冻融，否则会导致模板的降解，影响 PCR 效率；
4. 95℃，5 min 步骤必须进行，否则会抑制后续 PCR 反应；
5. 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；
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服、佩戴口罩、眼罩、一次性手套等采取防护性措施进行实验操作；
7. 本产品仅作科研用途。

【常见问题与解决方案】

常见问题	解决方案
扩增产量低或者无法扩增	1. 组织中的一些 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 70℃孵育时间适当延长； 3. 95℃，5 min 该步骤：不可省略，可在沸水浴中进行； 4. PCR 循环数不够：一般而言，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. 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. 延伸时间不应超过 60 s/kb； 3. 优化退火温度； 4. 减少总循环数； 5. 降低引物浓度； 6. 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。