

Version: AF 4.0 (2024.02.20修订)

Spark Mouse Tail Direct PCR Kit

目录号: AF1303

01/产品组分

序号	组分	AF1303 200rxn(50μL/rxn)
1	2×Spark Taq Plus Master Mix (with Dye)	1 mL×5
2	1×Mouse Tail Lysis Buffer	20 mL×2
3	Proteinase K	800 μL
4	25 mM MgCl ₂	500 μL
5	5×PCR Enhancer	1 mL×2

02/保存条件

1×Mouse Tail Lysis Buffer于4℃保存，其他组分于-20℃保存。

03/产品概述

本试剂盒包含整套的 DNA 粗提取以及 PCR 扩增体系，适用于小鼠基因型快速鉴定（Rapid Genotyping）。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，极大缩短了实验时间。使用时，将组织浸泡在添加了 Proteinase K 的裂解液中，55℃孵育 20 min 后，95℃加热 5 min 灭活 Proteinase K。裂解产物经离心后可直接用做 PCR 扩增模板，经反复测试广泛适用于 2 kb 以内目标片段的扩增，并适用于 4 对引物以内的多重 PCR 反应。

试剂盒中配有 2×Spark Taq Plus Master Mix (with Dye)，包含高性能的 Spark Taq Plus DNA Polymerase，dNTP 以及优化的缓冲体系。进行 PCR 扩增时只需加入引物和模板即可，减少了开管、移液等操作，显著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。独特的保护剂使得 Spark Taq Plus Master Mix 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。体系中预混有染料，可直接进行电泳。PCR 产物的 3' 端带 A，可直接用于 T/A 载体克隆。

04/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。

05/质量控制

50 μ L PCR 反应体系中，以 2 μ L 小鼠尾巴裂解产物为模板，扩增小鼠 p53 基因。35 个循环后取 1/10 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，可见有单一的 2 kb 条带。

06/实验步骤

DNA 提取：

推荐组织使用量：1-3 mm 小鼠尾尖；2-5 mm² 小鼠耳朵；1-2 个小鼠脚趾。

1. 根据需要裂解的样品数量，配制适量 1 $\times$ 裂解液，单个样品所需裂解液配制方法如下：

1 $\times$ 裂解液（单样品）	
Proteinase K	4 μ L
1 $\times$ Mouse Tail Lysis Buffer	200 μ L

▲应使用新配制的 1 $\times$ 裂解液，各组分添加完成后涡旋震荡，充分混匀后再使用。

2. 取 200 μ L 1 $\times$ 裂解液加入到所需裂解的组织中，涡旋震荡后在 55 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 20 min。对于常规大小目标片段，孵育 20 min 足以释放足量的 DNA 模板。孵育时间可根据实际情况进行调整，下表为不同长度的扩增片段在 55 $^{\circ}$ C 下所推荐的孵育时间。
- 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。

扩增片段长度	55 $^{\circ}$ C 推荐孵育时间
-500 bp	10 min
-1000 bp	20 min
-1500 bp	30 min

3. 孵育完成后，将样品置于 95 $^{\circ}$ C 或沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K。
4. 将裂解产物涡旋震荡充分混匀后，12,000 rpm 离心 5 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 $^{\circ}$ C 可存放至少三个月。

07/实验流程

反应体系

操作在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀后使用，用完后请及时放回-20℃保存。反应体系不同，可按此比例增加或减少产品用量。

Components	Volume
2×Spark Taq Plus Master Mix (with Dye)	25 µL
裂解产物	2-5 µL
Forward Primer (10 µM)	2 µL
Reverse Primer (10 µM)	2 µL
ddH ₂ O	up to 50 µL

▲ 2×Spark Taq Plus Master Mix (with Dye) 中预混有终浓度 1.5 mM 的 Mg²⁺。在实际使用时，可使用试剂盒提供的 25 mM MgCl₂ 进行调整，调整间隔为每次增加 0.5 mM。

▲ 若扩增的是高 GC 含量或复杂结构的片段，建议配制反应体系时加入 PCR Enhancer，PCR Enhancer 为 5× 浓度，使用终浓度为 1×。如 20 µL 的 PCR 体系加 4 µL PCR Enhancer，50 µL 的 PCR 体系加 10 µL PCR Enhancer。

▲ 裂解产物加入量不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

反应程序

94°C:	5 min	
94°C:	30 sec	} 35 cycles
56-72°C:	30 sec	
72°C:	30 sec/kb	
72°C:	7 min	

▲ 退火温度需根据引物的 T_m 值进行调整，若有需要，可通过进行退火温度梯度 PCR 寻找引物与模板结合的最佳退火温度。

08/结果检测

反应结束后取 5 µL 反应产物，在适合浓度的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。如果 PCR 产品中含染料，那扩增后的产物不需加上样缓冲液，可直接上样进行电泳。

09/注意事项

- ◇ 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；
- ◇ Proteinase K 灭活步骤（95°C，5 min）必须进行，否则其残留活性会抑制后续 PCR 反应。

10/相关产品

AA1002 SPARKeasy 组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒（含蛋白酶 K）

AJ0101 Spark 2000 DNA Marker

AJ0206 Spark 50×TAE Buffer

AJ0210 Sparkred

AC1709 RNase-Free and DNase-Free 纯水

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

