鼠尾鉴定试剂盒使用说明
Mouse Genotyping Kit

产品简介

本试剂盒专用于小鼠基因型的快速鉴定。仅需 1-2mm 小鼠尾部组织或脚趾，短短 15 分钟即可获取足够量的 DNA 模板直接用于 PCR 反应，无需抽提与纯化。

未提纯的 DNA 样品含有许多 PCR 抑制成分，对 PCR 酶的兼容性有很大要求。本试剂盒中配套的 Direct PCR Taq Mix 经过优化，对未提纯模板中的抑制成分有很强的耐受性，可兼容未提纯 DNA 模板，实现一步法 PCR 鉴定。Direct PCR Taq Mix 中含有 loading dye，PCR 后可直接跑凝胶电泳，省时方便。

试剂盒组成：

组分	YK-MG-100	YK-MG-250	YK-MG-1000	储存温度
Tail Lysis	5 mL	12.5 mL	50 mL	常温
Direct PCR Taq Mix（+Dye）	1.25 mL	3.2 mL	12.5 mL	-20℃
TailAmp Ctrl	200 μL	500 μL	2 mL	-20℃

*试剂有效期为 12 个月，请注意试剂的保存温度，Tail Lysis 开封后请按照指示在室温存放。

.

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

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 μL Tail Lysis，裂解液需没过鼠尾。

③ 将 EP 管放到 95℃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 μL Tail Lysis，裂解液需没过鼠尾。

③ 将 96 孔 PCR 板放到 PCR 仪中，95℃，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。

PCR 鉴定

将 Direct PCR Taq Mix（+Dye）和 TailAmp Ctrl 从-20℃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）
Direct PCR Taq Mix（+Dye），2x	12.5 μL
鼠尾裂解产物	1 μL
鉴定引物 F（10 μM）	1 μL
鉴定引物 R（10 μM）	1 μL
ddH_2O	9.5 μL
总体积	25 μL

表 2. PCR 对照配制体系

试剂	体积（每反应）
Direct PCR Taq Mix（+Dye），2x	12.5 μL
鼠尾裂解产物	1 μL
TailAmp Ctrl	2 μL
ddH_2O	9.5 μL
总体积	25 μL

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。

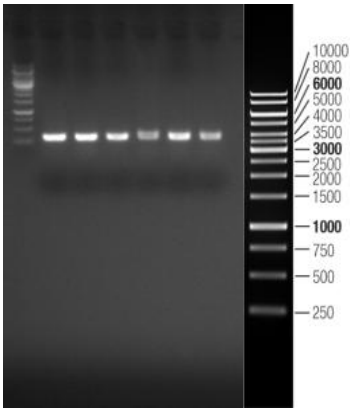
PCR 反应程序如下表：

表 3. PCR 鉴定程序

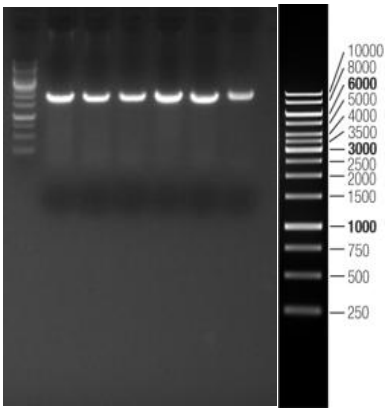
步骤	温度	时间	循环
预变性	95℃	3 min	1 cycle
循环扩增	95℃	15 s	35~40 cycles
	60℃	15 s	
	72℃	1 min/kb	
延伸补偿	72℃	5 min	1 cycle

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 μL 进行电泳的结果。图 2 是对小鼠某个基因进行鼠尾鉴定的结果，取 5 μL 进行电泳，目的条带大小为 2 k。胶图中的扩增条带明亮且单一，说明本产品获得的 DNA 模板足够用于鼠尾基因型鉴定，且扩增效果良好。

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 Tail 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 Direct PCR Taq Mix（+Dye）。

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 可以扩增多大的片段?

由于粗提样本中含有抑制 PCR 反应的因子，会影响 PCR 酶的活性，建议扩增片段长度设计在 3 k 以内。如有更大片段需求请咨询沟通。

⑥ Tail Lysis 储存到-20℃，对 Tail Lysis 的使用是否影响?

Tail Lysis 储存到-20℃无影响，使用前需要提前将 Tail Lysi 恢复至室温即可，防止 Tail Lysis 中的物质析出，对实验造成的影响。后续 Tail Lysis 的储存放置常温即可。