

For research use only

Version Number: 1.1

Zebra Fish Direct PCR Kit

For performing PCR directly from zebra fish tissue,tail fin or eggs without prior DNA purification

试剂盒组成		TP-01111	TP-01113
(100 μL 裂解体系 + 20 μL PCR 体系)		200 T	2000 T
Part I	Buffer FP	20 mL	100 mL × 2
	Foregene Protease	800 μL	8 mL
	6× DNA Loading Buffer	1.5 mL	6 mL
Part II	2× PCR Easy™ Mix	1 mL × 2	1.7 mL × 12
说明书		1 份	1 份

产品简介

本产品采用独特的裂解缓冲液体系可以快速的从斑马鱼等淡水鱼类组织、尾鳍或鱼卵样本中释放出基因组 DNA，用于 PCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65℃条件下 10-30 min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 等的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 PCR 反应。

2× PCR Easy™ Mix 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Foregene D-Taq DNAPolymerase、dNTPs、MgCl2、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2 Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

运输及储存条件

- ❖ 运输条件：全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于<4℃ 状态。
- ❖ 保存条件：本试剂盒 Part I 保存在 2-8℃；Part II 保存在-20℃。

产品特点

- ❖ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ❖ 样品需求量小，少到 1 mg 鱼尾鳍或 10 枚鱼卵即可进行实验。
- ❖ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ❖ 优化的 PCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。

注意事项：（请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项）

- ❖ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ❖ 请尽量使用新近采取的斑马鱼组织样本进行实验，若组织样本存储较长时间，避免样本反复冻融。
- ❖ 若 Buffer FP 有沉淀析出，可放置于 37℃待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ❖ Foregene Protease 具有独特配方，请置于 4℃存储，切勿置于-20℃。
- ❖ 2× PCR Easy™ Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ❖ 如果环境温度过高，2× PCR Easy™ Mix 可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2 min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。
- ❖ 电泳检测时，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer，否则在电泳时会在泳道中出现一大团拖尾亮带，影响实验结果判断。

操作指南

A：样本 DNA 释放

1. 在离心管中加入 **100 μL Buffer FP**， **4 μL Foregene Protease**，轻微涡旋混匀。
- 注意：Buffer FP 与 Foregene Protease 混合后不宜长期保存，配制后请尽快使用。
2. 剪取 5-10 mg 斑马鱼组织(或 1-3 mg 斑马鱼尾鳍或取 10 枚斑马鱼鱼卵)放入上述离心管中，轻微涡旋混匀。
- 注意：尽量剪碎组织或尾鳍，以便酶解反应更顺利的进行。
3. **65℃**孵育 **10-30 min**，然后 **95℃**处理 **5 min**。
- 注意：65℃孵育，一般只需 10 min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难酶解，可以将时间延长至 30 min。组织块不需完全酶解，残余的部分在后续离心步骤中可被除去。
4. 12,000 rpm (~13,400 ×g)离心 5 min。
5. 转移上清至新的离心管，4℃或-20℃放置备用或直接用于 PCR 扩增。

B：PCR 反应鉴定

1. 在 PCR 管内加入相应的 2× PCR Easy™ Mix 以及特异引物待用。
2. 取适量的 A 步骤处理好的裂解混合液添加到上述配制的 PCR 体系中(体系配制见下表 1)。
- 注意：用于后续 PCR 检测时，模板量占 PCR 体系的 **1-10%**之间最佳，不能超过 20%。如 50 μL 的 PCR 体系中，加入 0.5-5 μL 裂解液即可，但不能超过 10 μL。
3. 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(反应条件见下表 2)。
- 注意：尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应，可以得到更好的结果。
4. 琼脂糖凝胶电泳检测结果。
- 注意：建议使用随试剂盒配送的 6× DNA Loading Buffer，切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer 进行电泳。

表 1：PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2× PCR Easy™ Mix	10 μL	25 μL	1×
Forward Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM ^{1*}
Reverse Primer(10 μM)	0.5 μL	1 μL	0.2-0.25 μM ^{1*}
裂解混合液(DNA模板) ^{2*}	X μL	X μL	
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	(9-X) μL	(23-X) μL	
Total Volume	20 μL	50 μL	

1*：通常引物终浓度为 0.2-0.25 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μM 范围内调整引物浓度。

2*：裂解产物作为 PCR 模板，加入量在 PCR 体系 1-10%之间最佳，实际操作可进行模板加入量条件摸索，找到最佳模板用量。

注意：此体系配制仅作参考，实验室可根据需要调整 PCR 体系大小，添加适当比例的裂解混合液即可。配制好 PCR 反应体系，置于涡旋仪上涡旋混匀，瞬时离心将反应液集于管底。

表 2：反应条件举例

步 骤	温 度	时 间	循 环 数	内 容
1	94℃	3 min	1	预变性
2	94℃	10 sec	30-40	变性
3	55-65℃	20 sec		引物退火
4	72℃	X min (2kb/min) ^{2*}		延伸
5	72℃	5 min	1	终延伸

1*：2× PCR Easy™ Mix 对高 GC 含量的模板具有很好的扩增能力，在进行 PCR 时，我们建议所有引物的退火温度比 T_M 值高 2℃。

2*：1 kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30 sec。

注意：此表 PCR 条件仅供参考。PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。