

## ***BG Sciences Direct Mouse Genotyping Kit***

使用前请仔细阅读说明书

目录号: **SG001**

**保存:**

2×PCR Master Mix (With Dye) -20℃保存, 其他组分常温保存。有效期两年。

**产品说明:**

本试剂盒专为小鼠快速基因型鉴定而研制, 能够迅速从小鼠尾巴、耳朵或脚趾等(新鲜或冻存)组织中释放足量的基因组 DNA, 消化时间仅需 10 分钟, 无需抽提与纯化, 可直接将消化产物作为模板进行 PCR 扩增。

**特点:**

直接以裂解物为模板进行 PCR, 操作快速简便, 扩增效率高, 适合高通量鉴定。

**试剂盒组成**

<b>Component</b>	<b>SG001-01 (100rxns)</b>	<b>SG001-02 (500rxns)</b>
SG1 Buffer	10ml	50ml
SG2 Buffer	1 ml	5 ml
2×PCR Master Mix (With Dye)	1 ml	5 ml

**操作步骤**

**A: 模板制备**

1. 剪取小鼠组织置于干净的 EP 管, 取样量如下:

鼠耳: 打直径 3mm 的圆孔或者剪下近似大小的耳朵

鼠趾: 约 2mm 长左右的脚趾 (不含指甲的长度)

鼠尾: 约 2mm 的尾尖

2. 向每个含有样本的 EP 管中加入 100μL SG1 Buffer, 95℃水浴/金属浴中消化 10min。组织消化时, 务必将组织完全浸没于消化液中。消化完成后, 组织外观上仍然完整, 但足量的基因组 DNA 已经释放, 不影响后续的 PCR 实验。

3. 消化后冷却至室温 (若管壁上有溶液残留, 可快速离心一下), 然后向每个 EP 管中加入 8.6 μL SG2 Buffer, 轻弹 EP 管 3-4 次混匀, 8000g 离心 5min, 取上清作为 PCR 的模板。消化后的上清可-20℃保存 3 个月以上。

## B: PCR 扩增（推荐 PCR 体系及条件如下）

Component	volume	Step	Temp.	Time	Cycle
ddH <sub>2</sub> O	8μL	1	95°C	5min	
Forward primer(10μM)	0.5μL	2	95°C	30sec	2-4, 35
Reverse primer(10μM)	0.5μL	3	55-65°C	30sec	
Template DNA	1μL	4	72°C	30sec	
2 x PCR Master Mix	10μL	5	72°C	7min	
<b>Total volume</b>	<b>20μL</b>	6	16°C	--	

## C: 琼脂糖凝胶电泳

试剂 2xPCR Master Mix 中含有溴酚蓝染料，PCR 产物可直接点样进行琼脂糖凝胶电泳。

## 鉴定实例



Marker-1500bp\1000bp\900bp\800bp\700bp\600bp\500bp\400bp\300bp\200bp\100bp  
 样品：某基因CKO杂合子（flox/+）互配子代鼠尾  
 预期条带大小：WT: 241 bp；MT: 313 bp

基因型	小鼠编号
阴性鼠（WT）	4, 5, 6, 7
杂合子（flox/+）	1, 3, 8, 11, 13, 15
纯合子（flox/flox）	2, 9, 10, 12, 14, 16

## 常见问题及对策

常见问题	可能原因	对策
样本组与阳性对照组均无扩增条带	PCR 反应条件设置不当	优化 PCR 反应条件
	PCR 引物质量问题	重新设计 PCR 引物
	2×PCR Master Mix 运输或储存不当失活	更换新的试剂
样本组无扩增条带而阳性对照组正常	不当储存或长期储存引起试剂活性丧失	更换新的试剂
	组织消化不够充分	延长 95°C 消化时间至 20 min
存在非特异性扩增条带	PCR 退火温度太低，循环数、引物浓度或模板浓度太高	增加 PCR 退火温度，降低 PCR 循环数、引物浓度或模板浓度
	PCR 引物错配	重新设计 PCR 引物
	配制 PCR 反应体系时温度太高或配制完后放置时间太久	PCR 反应体系的配制在低温下进行，配制完成后尽快进行 PCR 扩增反应