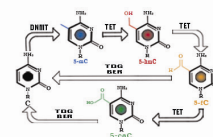




艾德科技(北京)有限公司
A&D Technology Corporation

A&D, Lab Good Partners!



地址: 北京市昌平区中关村生命科学园路东60米
电话: 010-52406250/57225208
技术电话: 18911529660 技术QQ: 1951545998

网址: www.aderr.com E-MAIL: tech@aderr.com

Blood SuperDirect™ PCR Kit

For EDTA Only(EDTA 抗凝血)

TP-01221	0.5ml(20μl×50Preps)
TP-01222	1ml(20μl×100Preps)
TP-01223	5ml(20μl×500Preps)
TP-01224	20ml(20μl×2000Preps)

For Heparin Only(肝素抗凝血)

TP-01231	0.5ml(20μl×50Preps)
TP-01232	1ml(20μl×100Preps)
TP-01233	5ml(20μl×500Preps)
TP-01234	20ml(20μl×2000Preps)

Store at -20℃



目录

产品介绍	1
产品特点	1
试剂盒应用	1
试剂盒内容	2
试剂盒组分信息	2
储存条件	2
产品质量控制	3
注意事项	3
试剂盒应用实例	3
操作前准备事项	3
操作指南	5
直接法	5
裂解法	6
PCR 引物设计原则	8
对照反应	8
阳性对照	8
阴性对照	9
操作示意图	10
问题分析指南	11

产品介绍

本产品采用独特的 PCR 缓冲液体系，无需 DNA 提取或样品处理即可以全血样本为模板进行直接 PCR。EDTA、Heparin 抗凝全血以及含有血液的采集卡（如 Whatman 903® 和 FTA® 采血卡）均可直接用于 PCR 扩增鉴定，极大的缩短了检测时间。本试剂盒提供的 2xSuperEasy™ Mix 具有很强抑制物耐受性，人血的模板最大加入量可达 45%，鼠血的可达 20%，可以灵敏的扩增血液样本中基因组和外源目的 DNA 片段。

本产品中的 2xSuperEasy™ Mix 包含本公司特有的 ForegeneTaq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、Taq Reaction Buffer、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化即可进行目的基因的鉴定。
- ◆ 体系对血液的耐受能力强，可以灵敏的检测出血液中基因组和外源目的 DNA 片段。
- ◆ 2xSuperEasy™ Mix 血液耐受度高：人血可达 45%，鼠血可达 20%。
- ◆ 样本全封闭式操作，无需担心样本污染和 PCR 结果假阳性。

试剂盒应用

专用于：

- ◆ 专用于 EDTA 或 Heparin 抗凝全血直接 PCR 鉴定。
（包括：人血、鼠血、鸡血、鸟血、牛血、狗血等）

也可用于：

- ◆ 常规 PCR 扩增 DNA 片段。
- ◆ PCR 扩增 GC 含量高 (>60%)、具有二级结构的模板基因。
- ◆ 分子标记检测。
- ◆ PCR 产物末端加 A。

试剂盒内容

For EDTA Only			For Heparin Only		
订货号	试剂(SP-20031)	含量	订货号	试剂(SP-20032)	含量
TP-01221	2xSuperEasy™ Mix	0.5ml	TP-01231	2xSuperEasy™ Mix	0.5ml
TP-01222	2xSuperEasy™ Mix	1ml	TP-01232	2xSuperEasy™ Mix	1ml
TP-01223	2xSuperEasy™ Mix	5ml	TP-01233	2xSuperEasy™ Mix	5ml
TP-01224	2xSuperEasy™ Mix	20ml	TP-01234	2xSuperEasy™ Mix	20ml

试剂盒组分信息

- For EDTA Only: 2xSuperEasy™ Mix(SP-20031)
- For Heparin Only: 2xSuperEasy™ Mix(SP-20032)

储存条件

本试剂盒保存于-20℃；若频繁使用，也可置于4℃短期保存（限10天内用完）。

产品质量控制

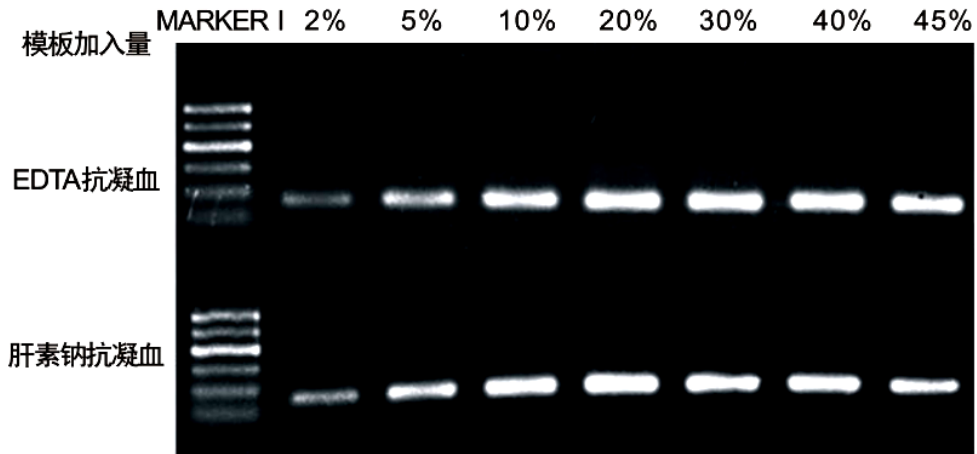
按照福际生物试剂盒质量检测体系标准，每一批次的产品都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。经检测2xSuperEasy™ Mix能有效扩增人及小鼠基因组中的单拷贝基因；可4℃放置一周，活性无明显变。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致作为PCR模板的DNA片段较小，影响PCR效率。
- ◆ 2xSuperEasy™ Mix应避免反复冻融，否则会影响PCR效率。
- ◆ 如果环境温度过高，2xSuperEasy™ Mix可能会变浑浊，可置于冰上放置1-2min，待溶液澄清，上下颠倒混匀3-5次后再使用。

直接 PCR 实例电泳图

Blood SuperDirect™ PCR Kit 可以多种来源抗凝全血为模板扩增目的基因，2xSuperEasy™ Mix有很强的PCR反应抑制物耐受性，检测灵敏度高、扩增特异性强。以人血为模板扩增相关基因，1%琼脂糖凝胶电泳分析，见下图：



在反应体系中，以EDTA和肝素钠抗凝的人血为模板扩增SOX2基因(163bp)，模板加入量由2%-45%。经过30个循环，扩增结果如图所示。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。Blood SuperDirect™ PCR Kit 操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 保存好的抗凝全血(EDTA 或 Heparin 抗凝)。
- ◆ 0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ PCR 仪、移液器等。

操作指南

该试剂盒操作简便，只需取适量抗凝血液加入 2xSuperEasy™ Mix 中，添加相应引物、ddH₂O 补齐体系即可进行 PCR 扩增。具体的操作见下详细操作步骤：

1. 在 200μl PCR 管内加入 2xSuperEasy™ Mix、引物、适量的 ddH₂O 待用。
2. 取适量抗凝血液加入上述配制的 PCR 体系中，使得 2xSuperEasy™ Mix 稀释至 1x（体系配制见表一）。
3. 根据优化好的 PCR 条件（退火温度等）进行 PCR 反应（反应条件见表二）。

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：扩增完成后，将 PCR 产物移至离心机中，10,000×g 离心 2min，收集上清液进行电泳检测。

PCR 反应体系配制(表一)

PCR 体系添加内容	用量		终浓度
2xSuperEasy™ Mix	10μl	25μl	1x
Forward Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM1*
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM1*
抗凝全血2*	Xμl	Xμl	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X)μl	(23-X)μl	
Total Volume	20μl	50μl	

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

2*：若模板使用含有血液的采集卡，可截取直径1-4mm的血点，直接加入20-50μl PCR 反应体系进行扩增。

注意：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。

PCR 反应条件举例 (表二)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94℃	3min	1	预变性
2	94℃	30sec	35-40	变性
3	45-70℃	30sec		引物退火
4	72℃	x min (1kb/min)		延伸
5	72℃	5min	1	终延伸

注意：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。

PCR 对照反应

在PCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行PCR时，设置阳性和阴性PCR对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

A : 阳性对照

选用容易扩增的样本保守基因的引物和采用纯化的样本DNA作为模板进行阳性对照反应以确定PCR反应体系和条件的正确性以及2xSuperEasy™ Mix有效性。其反应体系的配制见表五。

阳性对照反应体系配制(表五)

PCR 体系添加内容	用量		终浓度
2xSuperEasy™ Mix	10μl	25ul	1x
Forward Primer (10μM) 1*	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
Reverse Primer (10μM) 1*	0.5μl	1μl	0.2-0.25μM
DNA模板2*	Xμl	Xμl	100-200ng
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	(9-X) μl	(23-X) μl	
Total Volume	20μl	50μl	

1*：引物可选用该样本比较容易扩增的保守基因的引物，如β-Actin基因（请确保这些引物的可用性）。

2*：可选用样本纯化的DNA，也可根据实验需要，自行选择。

B : 阴性对照

PCR反应体系被污染会导致PCR结果出现假阳性，需要设置阴性对照来排除。将使用的移液器枪头浸泡在2×SuperEasy™ Mix, 添加引物, ddH₂O进行PCR扩增; 另取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染和实验是否有其他污染源。

操作示意图



问题分析指南

以下针对 Blood SuperDirect™ PCR Kit 在样本直接 PCR 实用中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail: Tech@foregene.com。

在试剂盒的使用过程中往往会遇到许多问题，比如：没有 PCR 扩增产物、PCR 特异性差等，下面就使用 Blood SuperDirect™ PCR Kit 可能会遇到的问题进行分析。建议在进行直接 PCR 的同时设置阳性对照或阴性对照以便后续分析实验结果。

现象	原因	建议
正对照、待测样本均无条带	PCR 反应体系或反应条件不合适。	使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。
	PCR 试剂保存不当失去活性。	2xSuperDirect™ PCR Easy Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃ 短时间存放。
	引物设计问题	尝试重新设计引物进行检查
正对照有目的条带，待测样本无条带或条带弱	血液样本保存不当，基因组 DNA 降解。	抗凝全血可在 4℃ 保存 2-8 天，需长时间保存可将样本置于在-20℃或-70℃冻存，并避免反复冻融。
	PCR 循环数不足。	适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。
	模板加入量不适合	可在 PCR 体系 10%-30% 范围内优化血液加入量；若是扩增血液样本中的病毒或细菌 DNA 片段，可将模板量增加至 30%-40%。
非特异性扩增	退火温度偏低。	适当提高退火温度。
	PCR 循环数过多。	适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。
	引物浓度偏高。	适量降低引物用量。

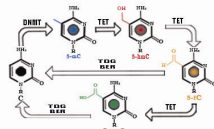
	模板加入量过多。	将模板加入量控制在 10-20%。
空白对照出现目的条带	操作工具或试剂污染	实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。

中国·福际 World's Foregene



A&D, Lab Good Partners !

艾德科技（北京）有限公司
A&D Technology Corporation



地址：北京市昌平区中关村生命科学园路东60米
电话：010-52406250/57225208
技术电话：18911529660 技术QQ：1951545998

网址：www.aderr.com E-MAIL:tech@aderr.com

