

Phire®动物组织直接 PCR 试剂盒

产品货号: F-140, 200rxns x 20µl

稀释缓冲液可足够用于 250 个稀释反应 (20µl)
-20℃ 保存, 有效期为 1 年。稀释缓冲液一旦解冻,
可放于 4℃ 保存。

1. 简介

Thermo Scientific Phire 动物组织直接 PCR 试剂盒可以直接对动物来源的非固定组织样本进行 PCR, 而无需在此之前进行 DNA 的纯化。像老鼠的耳朵和尾巴, 斑马鱼鳍以及果蝇都可做起始材料。这些样本可以是新鲜的, 也可以是-20℃ 贮存的。用此试剂盒测试过的动物组织样本列表可登陆我们的网站:
www.finnzymes.com/directpcr 查询。

Phire 动物组织直接 PCR 试剂盒中所配备的聚合酶是 Phire 热启动 II DNA 聚合酶。该酶是一种特殊的工程酶, 融合有 DNA 双链结合蛋白, 不但聚合能力强, 而且对多种动物组织中的 PCR 抑制剂表现出超强的抵抗力。

Phire 动物组织直接 PCR 试剂盒包含了适用于直接法和稀释法两种操作流程的试剂和工具。关于操作流程的选择请参照 4.3。

为了便于取样, 试剂盒中还包含了一个 0.5mm 的 Harris Uni-Core™ 取样器和配套的 Harris 切片垫。

此外, 该试剂盒还包含了一对适用于多种脊椎动物 (详见第 7 节) 的对照引物。对于其他物种, 如果蝇和斑马鱼, 它们的对照引物序列可查询 www.finnzymes.com/directpcr。此产品推荐用来做终点 PCR。

重要提示

- 请使用 98℃ 进行变性。
- 退火温度的设置与众多常规 DNA 聚合酶 (如 Taq DNA 聚合酶) 不同, 详见 6.3。
- 当使用直接法进行扩增时, 请使用 50µl 反应体系。
- 将样品直接加入 PCR 反应液中而不是空白管中。
- 对两个或者两个以上的样品进行取样时, 每两个样品之间, 需清洁取样工具, 详见 4.2。
- 对以下三种情形, 推荐使用稀释法 (详见 4.3):
 - * 当使用新的样本材料或者新的引物时;
 - * 扩增困难样本或长片段时;
 - * 同一个样本进行多次 PCR 时。

2. 包装信息

组分	F-140
Phire 热启动 II DNA 聚合酶	200 µl
2x Phire 动物组织 PCR 缓冲液 (包含 dNTPs 和 MgCl ₂)	5 x 1 ml
对照引物混合物 (每种 25 µM)	40 µl
稀释缓冲液	5 ml
DNARelease™ 添加剂	3 x 100µl
凝胶上样染料	3 x 1 ml
Harris Uni-Core™ 0.50 mm 取样器	1
Harris™ 切片垫	1

实验所必需, 但试剂盒中未包含的组分: 2% 次氯酸钠溶液。

材料安全数据表见 www.finnzymes.com

3. PCR 操作指南

使用前请对各管小心混匀并离心, 以保证均质, 提高产物得率。PCR 体系的建立可在室温下完成。注意: 请于最后将样品加到反应体系中。请参照第 4 节的样品处理指南。

表 1. 加样指南

组份	20µl 反应体系	50µl 反应体系*	终浓度
H ₂ O	定容至 20 µl	定容至 50 µl	
2x Phire 动物组织 PCR 缓冲液	10 µl	25 µl	1x
引物 A	x µl	x µl	0.5 µM
引物 B	x µl	x µl	0.5 µM
Phire 热启动 II DNA 聚合酶	0.4 µl	1 µl	
样本量 (详见第 4 部分)			
直接法:	—	用量随样本不同而不同**	
稀释法:	1 µl	2.5 µl	

* 对于直接法, 推荐使用 50µl 反应体系。

** 动物组织取 0.5mm 大小或者更小的样本 (请参考 www.finnzymes.com/directpcr)。

表 2. 循环扩增程序推荐

循环步骤	两步法		三步法		循环数
	温度	温度	时间	温度	
起始变性	98℃	5min	98℃	5min	1
变性	98℃	5s	98℃	5 s	40
退火 (详见 6.3)	-	-	X℃	5 s	
延伸 (详见 6.4)	72℃	20s ≤1kb 20 s/kb > 1 kb	72℃	20s ≤1kb 20 s/kb > 1 kb	
最后延伸	72℃ 4℃	1min 保持	72℃ 4℃	1min 保持	1

4. 样品处理指南

为了获得小且均一的样本, 我们推荐使用试剂盒里提供的 Harris 取样工具。受取样材料厚度和坚固度的影响, Harris 取样器可重复使用次数不等, 最多可达 500 次。如果取样器被再次使用, 为了防止样品间的交叉污染, 正确清洁取样器的切割刃口是非常重要的 (详见 4.2 的清洁说明)。Harris 切片垫可以为 Harris 取样器提供最好的承载平面, 它由具有自我修复功能的惰性材料制成, 有两个承载表面。该切片垫可重复使用数百次。为了防止交叉污染, 当用其处理不同样本时, 在处理完一个样本后一定要对其进行清洁再用于另一个样本的处理 (详见 4.2)

Harris 取样工具可从我公司单独购买。

4.1 Harris 取样器的使用

Harris 取样器的刃口非常锋利, 因此使用该工具时要倍加小心。请遵循以下操作指南使用该取样器:

1. 将样本置于 Harris 切片垫上。

2. 小心去除取样器刃口上的保护帽。

3. 紧握打孔器, 向下推刃口使其进入样本, 然后反方向旋转打孔器, 直到穿透样本。整个操作只需要轻柔下压即可。该操作过程中请不要压上部的活塞。

4. 上提取样器, 将其从样本上移开。然后按压活塞将已取到的样本小块注射到 PCR 反应液中。确保样本置于 PCR 反应体系中, 而没有粘在管壁上。

5. 每处理完一个样本后请清洗取样器和切片垫, 方法如 4.2 中所述。

您可以在这个网址: www.finnzymes.com/directpcr, 看到取样和清洁操作的录像。

4.2 取样工具的清洁

为了防止样本间的交叉污染, 每处理完一个样本, 都需要对取样器的切割刃口进行清洁: 将刃口浸入 2% 的次氯酸钠溶液中, 上下抽压活塞进行冲洗, 然后用干净的纸巾擦干残液。切片垫在每次取样后也应用 2% 的次氯酸钠冲洗。

建议在所有实验中, 都增加一个没有 DNA 模板的阴性对照。为了检测交叉污染, 可将清洗后的打孔器浸入到阴性对照样本中 (详见 7.3)。关于使用 Harris 取样器时, 如何避免交叉污染的更多的信息请参考 www.finnzymes.com/directpcr 页面上的应用操作指南部分。

4.3 样本类型和操作方法

该试剂盒已经针对众多动物组织样本进行了优

化。请登陆 www.finnzymes.com/directpcr 网站查看已测试过的动物组织列表及相应的样本使用尺寸。除个别样本外，绝大多数类型的样本，既可使用直接法也可使用稀释法。但是，如果扩增长片段（如，从鱼鳍中扩增 > 500 bp 的片段或者从其他组织中扩增 > 1000 bp 的片段），推荐使用稀释法。另外，若需对同一个样本进行多次 PCR 或者对模板浓度要求较高，需进行浓度梯度检测才可确定模板用量的实验，也建议使用稀释法。如果您使用的是新的样本材料或者新的引物对，建议首先使用稀释法，因为如果需要优化实验，稀释法可以对同一个样本做多次试验。

4.3.1 直接法:

1. 使用 0.5mm 的 Harris 取样工具从动物组织上取一个样本。或者使用无菌的解剖刀切极小的一片组织（如果蝇的翅）。

2. 将所取的样本直接加入到 PCR 反应液中（50 μ l 体系）。注意：请将样本加入到液体中而不是一个空管内。确保样品处于 PCR 反应体系中。

凝胶电泳

对于直接法，推荐在凝胶上样缓冲液中加入 DNARElease™ 添加剂，否则 PCR 产物中存在的细胞碎片可能导致 DNA 片段滞留在加样孔中。您可以将 100 μ l 的 DNARElease 和 1ml 的凝胶上样染料混合，该混合液可在 4℃ 下稳定保存两周，若想长期使用，可贮存在 -20℃。在凝胶电泳前，加 15 μ l 的预混凝胶上样染料到 50 μ l PCR 反应液中。

4.3.2 稀释法:

在开始之前，开启加热器，使温度达到 98℃。

1. 将组织样本加入到 20 μ l 稀释缓冲液中。

2. 加入 0.5 μ l DNARElease 添加剂。简单地进行涡旋振荡，并离心。如果所使用的样本较大，相应地调整稀释缓冲液和 DNARElease 添加剂的体积，确保样本浸没在溶液中。

3. 将反应管先在室温中放置 2-5min，然后再将

其放入已预热的(98℃)的加热器中，继续孵育 2min。

4. 离心，使残余组织沉淀下来，转移上清到一新管中。如果该上清不立即使用，可将其贮存在 -20℃。

对于 20 μ l 的 PCR 反应体系，通常加 1 μ l 上清做模板就足够了。在某些实验中，可能需要对上清进行 1:10 或者 1:100 的稀释，或者将 PCR 反应体系扩大到 50 μ l。对于稀释法，无需在凝胶上样缓冲液中添加 DNARElease 添加剂。

5. 各反应组分说明

5.1 酶

Phire 热启动 II DNA 聚合酶具有 5'→3' DNA 聚合酶活性和弱的 3'→5' 外切酶活性。用 Phire 热启动酶扩增所得产物为平末端，故我们推荐使用平末端克隆。如果需进行 TA 克隆，可以使用 DyNAzyme™ II DNA 聚合酶（F-501）给平末端 PCR 产物加 A 尾，其操作指南可在我们的相关网站上找到（www.finnzymes.com）。

5.2 动物组织 PCR 缓冲液

试剂盒中所配备的 2x Phire 动物组织 PCR 缓冲液已经针对动物材料进行过严格优化。它包含了 dNTPs 和终反应浓度为 1.5mM 的 MgCl₂。

5.3 稀释缓冲液

稀释缓冲液也经过严格优化，若在其中加入 DNARElease，则可从众多不同的动物组织样本中释放 DNA（详见 5.4）。该缓冲液也可用于贮存 DNA 样品，在 4℃ 进行短时间贮存。对于长期贮存，推荐将上清转移到一个新管中，然后再将其贮存在 -20℃。

5.4 DNARElease™ 添加剂

如果使用直接法对某种组织样本进行 PCR 扩增，则需要在凝胶上样缓冲液中加入 DNARElease 添加剂，否则残留在 PCR 产物中的细胞碎片可能导致 DNA 片段滞留在凝胶上样孔中。DNARElease 添加剂也可以

应用在稀释法中，以促进组织样本释放 DNA。

5.5 引物

引物的终浓度推荐使用 0.5 μ M。引物 T_m 值的计算结果会随着使用方法的不同而有所不同。请使用我们网站上 (www.finnzymes.com) 的 T_m 计算器和操作指南计算引物的 T_m 值，进而确定合适的退火温度。

6. 循环条件说明

6.1 初始变性

使用直接 PCR 法，初始变性时间需要延长到 5mins，以使细胞裂解，基因组 DNA 释放。

6.2 变性

变性时间尽可能短。对于大多数样本，设置为 98 $^{\circ}$ C，5s 就足够了。注意：变性时间和温度可能会随着热循环仪的缓变率和温度控制模式而改变。

6.3 引物退火

注意，Phire 热启动 II DNA 聚合酶最佳的退火温度与其他基于 Taq 的聚合酶有着明显不同。请使用我们相关网站 (www.finnzymes.com) 上的 T_m 计算器和操作指南确定特定引物的 T_m 值和最适的退火温度。设置引物退火温度的基本原则是：若引物 >20nt，则退火程序设置为：T_m+3 $^{\circ}$ C，5s，该 T_m 值指两引物中较低的那一个 T_m 值；若引物所含碱基数 $\leq$ 20nt，则直接使用两引物中较低的那一个 T_m 值作为退火温度。如果有必要，可以使用温度梯度找到每一对模板/引物的最适退火温度。退火梯度可以扩展到延伸温度（两步法 PCR）。对于 T_m 值较高的引物对（T_m 至少在 69-72 $^{\circ}$ C），建议使用无退火步骤的两步法循环。

6.4 延伸

延伸在 72 $^{\circ}$ C 下进行。对于片段 $\leq$ 1kb 的扩增子，延伸时间建议设置成 20s，对于片段 >1kb 的扩增子，

延伸时间建议按照 20s/kb 进行设置。

7. 对照反应

7.1 使用对照引物进行直接 PCR 对照反应

当以哺乳动物组织样本（如小鼠组织）为模板时，我们建议无论使用直接法还是稀释法进行直接 PCR 实验，最好设置对照反应。对照引物随试剂盒提供，模板可使用实际实验所要检测的样品。

对照引物是溶解于水中的兼并引物混合物，可扩增哺乳动物基因组 DNA 中 237bp 的片段。该扩增区位于 SOX21 基因¹上游，是一高度保守的非编码区。此引物广泛适用于各类脊椎动物物种。

每一种引物的浓度是 25 μ M。

Primer 1 (24-mer)

5'- AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG -3'

熔点: 73.5 $^{\circ}$ C

Primer 2 (27-mer)

5'- GCACTCCAGAGGACAGCRGTGTCAATA -3'

熔点: 72.2 $^{\circ}$ C (R=A), 75.3 $^{\circ}$ C (R=G)

请注意该对照引物与鱼和昆虫样本不兼容。对于果蝇和斑马鱼的对照引物序列可参照 www.finnzymes.com/directpcr。

表 3. 对照反应的加样指南

组份	20 μ l 反应体系	50 μ l 反应体系*	终浓度
H ₂ O	定容至 20 μ l	定容至 50 μ l	
2x Phire 动物组织 PCR 缓冲液	10 μ l	25 μ l	1x
对照引物混合物	0.4 μ l	1 μ l	0.5 μ M
Phire 热启动 II DNA 聚合酶	0.4 μ l	1 μ l	
样本量 (详见第 4 部分)			
直接法:	—	用量随样本的不同而不同**	
稀释法:	1 μ l	2.5 μ l	

*对于直接法, 推荐使用 50 μ l 反应体系。

**动物组织取 0.5mm 大小或者更小的样本 (请参考 www.finnzymes.com/directpcr)。

表 4. 对照反应的循环程序设置说明

循环步骤	温度	时间	循环数
起始变性	98 °C	5min	1
变性	98 °C	5s	40
退火 / 延伸	72 °C	20s	
最后延伸	72 °C 4 °C	1min 保持	1

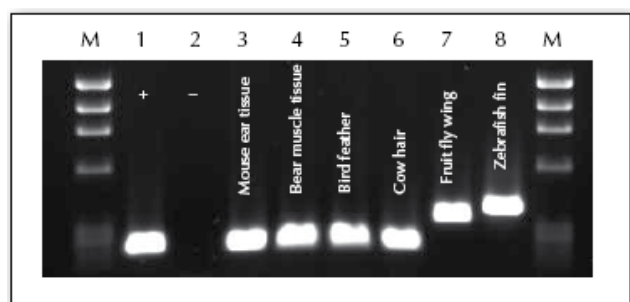


图 1. 从各种动物组织中扩增对照 DNA 片段。

少量组织样本被直接加入到 50 μ l PCR 反应液中。3-6 泳道的 PCR 片段是用试剂盒中配备的对照引物扩增而得的; 7-8 泳道中的片段是用从 www.finnzymes.com/directpcr 网站上获悉序列进而合成引物扩增而得的。+和-分别代表含有纯化 DNA 模板和未含 DNA 模板的对照。

7.2 加纯化 DNA 的阳性对照反应

当进行反应条件优化时, 建议设立一个以经过纯化的 DNA 为模板的阳性对照, 以确保 PCR 条件最优。若阳性对照扩增失败, 则在进行下一步实验之前要先对 PCR 条件进行优化。

7.3 阴性对照建议

对所有的直接 PCR 实验, 都设立一个不加模板的阴性对照。为了检测 Harris 取样器的洁净度, 将清洗后的打孔器浸入到阴性对照样品中。同时再增加一个未浸泡打孔器的阴性对照, 以验证是否有其它污染源。

8. 疑难解答指南

无扩增产物或者产物量很少

常见原因:

若阳性对照 (使用您自己的引物扩增经过纯化的 DNA) 扩增完成后检测无产物, 则建议:

- 确保加样无误, 且循环程序与我们推荐使用的程序一致。
- 检查引物设计。
- 优化退火温度 (做一个温度梯度试验)。
- 试验不同浓度的模板量。
- 优化变性时间。
- 增加延伸时间。

直接法:

若您的目的检测管没有扩增产物, 但以经过纯化的 DNA 为模板的阳性对照管和直接 PCR 对照反应管均有扩增产物, 则建议:

- 确保凝胶上样缓冲液加入了 DNARElease 添加剂。
- 使用更小的打孔器 (比如 0.35mm 的 Harris 取样器, F-180)。
- 使用稀释法。

稀释法:

若您的目的检测管没有扩增产物，但以经过纯化的 DNA 为模板的阳性对照管和直接 PCR 对照反应管均有扩增产物，则建议：

- 稀释上清：可用水或者 TE 对上清进行 1:10 或者 1:100 的稀释。然后取 1 μ l 稀释后的上清充当扩增模板。
- 确保进行了 98 $^{\circ}$ C 孵育 2min 的操作(详见 4.3.2, 第三步)。
- 尝试将稀释反应开始的孵育温度上调到 65 $^{\circ}$ C，而不是在室温。
- 尝试在反应管中捣碎样本。

产物非特异——呈现高分子量弥散条带

- 增加退火温度或者进行温度梯度 PCR。
- 减少总循环数。
- 降低引物浓度。
- 缩短延伸时间。
- 重新设计引物。。

产物非特异——呈现低分子量分散带。

- 增加退火温度或者进行温度梯度 PCR。
- 缩短延伸时间。
- 降低引物浓度。
- 减少总循环数。
- 重新设计引物。

9. 参考文献

1. Woolfe A. et al. (2005) PLoS Biology 3: 116–130.

运输和贮存

Phire 动物组织直接 PCR 试剂盒于冰上运输。到货后即将所有组分放入-20 $^{\circ}$ C 贮存。稀释缓冲液解冻后，可于 4 $^{\circ}$ C 贮存。