



Zebra Fish Direct PCR Kit

Cat.No.TP-0141T/01411/01412/01413

For zebra fish direct PCR using ≤ 10 mg tissue (or ≤ 3 mg tail fin or 10 eggs)

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

For research use only



目 录

| | |
|------------------|----|
| 产品介绍 | 3 |
| 产品特点 | 3 |
| 试剂盒应用 | 3 |
| 试剂盒局限性 | 4 |
| 产品质量控制 | 4 |
| 试剂盒内容 | 5 |
| 储存条件 | 5 |
| 试剂盒组分信息 | 6 |
| 注意事项 | 6 |
| 操作前准备事项 | 7 |
| 实验材料和设备 | 7 |
| 安全性 | 7 |
| 操作指南 | 8 |
| ● 斑马鱼直接 PCR 操作步骤 | 8 |
| PCR 对照反应 | 10 |
| 操作示意图 | 11 |
| 问题分析指南 | 12 |

产品介绍

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°C 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。

2x 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 ForegeneD-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 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

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 1mg 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。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：斑马鱼等淡水鱼类。
- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因型鉴定、基因分型等。

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段 $\leq 1\text{kb}$ ；超过 1kb，扩增效率下降或者扩增失败。
- ◆ PCR 产物如用于测序建议先进行 PCR 产物纯化。
- ◆ PCR 产物可能会有点突变，如用于基因克隆，请知悉。
- ◆ PCR 产物 3'末端随机加 A 尾。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的斑马鱼直接 PCR 系列试剂盒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。

试剂盒内容

| Zebra Fish Direct PCR Kit 斑马鱼直接 PCR 试剂盒 | | | | | |
|--|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| 试剂盒组成 | | TP-0141T | TP-01411 | TP-01412 | TP-01413 |
| | | 50 次 | 200 次 | 500 次 | 2000 次 |
| Part I | Buffer FP | 5ml | 20ml | 50ml | 100mlx2 |
| | Foregene Protease | 220µl | 880µl | 1.1mlx2 | 8.8ml |
| | 6x DNA Loading Buffer | 1.5ml | 1.5ml | 1.5ml | 1.5mlx4 |
| Part II | 2x PCR Easy™ Mix | 500µl | 1mlx2 | 1.7mlx3 | 1.7mlx12 |
| 说明书 | | 1 份 | 1 份 | 1 份 | 1 份 |

储存条件

1. 运输条件

全程低温冰盒运输，保证试剂盒 Part I、Part II 处于 < 4°C 状态。

2. 保存条件

本试剂盒 Part I 保存在常温或 2-8°C。

- ❖ 试剂 Buffer FP，在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。
- ❖ 试剂 Foregene Protease，具有独特配方，为保证其更好的活性和稳定性，请保存于 4°C。
- ❖ 试剂 6x DNA Loading Buffer，可置于 4°C 或 -20°C 长期保存。

本试剂盒 Part II 保存在 -20°C。

- ❖ 试剂 2x PCR Easy™ Mix，若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer FP: 提供斑马鱼组织裂解反应所需的环境。
- ◆ Foregene Protease: 在裂解缓冲液的环境下, 裂解斑马鱼组织, 释放基因组 DNA。
- ◆ 2x PCR Easy™ Mix: 包含福际生物特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时, 只需将适当的裂解混合液、引物、ddH₂O 添加到 2x PCR Easy™ Mix 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ 6x DNA Loading Buffer: 该 Loading Buffer 中不含有 SDS。建议在进行琼脂糖凝胶电泳时, 配搭使用试剂盒附赠的 6x DNA Loading Buffer, 以便取得好的电泳结果。切勿使用含有 SDS 的 Loading Buffer, 否则在电泳时会在泳道中有一大团拖尾亮光, 影响实验结果。

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, 请避免样本反复冻融。
- ◆ 若 Buffer FP 有沉淀析出, 可放置于 37°C 待沉淀消失, 并摇匀溶液后使用。
- ◆ Foregene Protease 具有特点配方, 请置于 4°C 存储, 切勿置于 -20°C。
- ◆ 2x 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, 2x PCR Easy™ 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。
- ◆ 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。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。斑马鱼直接 PCR 系列试剂盒操作简单、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。

设备

- ◆ 斑马鱼组织(新鲜的、冷冻保存的)、鱼鳍或鱼卵。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机($\geq 13,400\times g$)、PCR 仪、95°C 水浴或金属浴、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Foregene Protease: 增敏剂，刺激性。

操作指南

预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染取样器材。

斑马鱼组织直接 PCR 操作步骤

A. 样本 DNA 释放

1. 在离心管中加入 100 μ l Buffer FP，4 μ l 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 5-10mg 斑马鱼组织(或 1-3mg 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 $^{\circ}$ C 孵育 10-30min，然后 95 $^{\circ}$ C 处理 5min。
注意：65 $^{\circ}$ C 孵育，一般只需 10min 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 30min。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 \times g)离心 5min。
5. 转移上清至新的离心管，4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C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 \times PCR EasyTM 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 μ l 的 PCR 体系中，加入 0.5-5 μ l 裂解液即可，但不能超过 10 μ l。
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 2-1)。

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 6x 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 |
|----------------------------|---------|----------|--------------------------|
| 2x PCR Easy™ Mix | 10μl | 25μl | 1x |
| Forward Primer (10μM) | 0.5μl | 1μl | 0.2-0.25μM ^{1*} |
| Reverse Primer (10μM) | 0.5μl | 1μl | 0.2-0.25μM ^{1*} |
| 裂解混合液(DNA模板) ^{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0.2-0.25μM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*: 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：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°C | 3min | 1 | 预变性 |
| 2 | 94°C | 10sec | 30-40 | 变性 |
| 3 | 55-65°C ^{1*} | 20sec | | 引物退火 |
| 4 | 72°C | x min (2kb/min) ^{2*} | | 延伸 |
| 5 | 72°C | 5min | 1 | 终延伸 |

1*: 2x 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TM值高2°C。

2*: 1kb 以内的 DNA 片段，建议延伸时间为 30sec。

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。

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2x PCR Easy™ Mix有效性。其反应体系的配制见下表3。

表 3: 对照 PCR 反应体系配制

| PCR 体系添加内容 | 用 量 | | 终 浓 度 |
|-------------------------------------|---------|----------|------------|
| 2x PCR Easy™ 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、基因组上的保守序列等(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。取ddH₂O作为模板，用目的基因引物进行PCR扩增，以排除PCR体系是否被污染或实验是否有其他污染源。

操作示意图



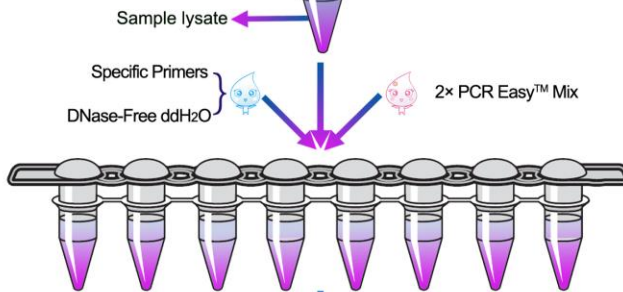
1-3mg组织或尾鳍或10枚左右鱼卵

裂解 { 100µl Buffer FP : 提供酶解环境 } 65°C ; 10-30min
 { 4µl Foregene Protease : 酶解组织 }

注意：65°C孵育，一般只需10min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30min。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。

失活：95°C；5min

离心：13,400×g；2min。
 上清转移至新的离心管中待用。



PCR扩增



PCR 反应体系

| 组分 | 体积 |
|-------------------------------|---------|
| (for 20µl PCR reaction) | |
| 2× PCR Easy™ Mix | 10µl |
| Specific Primers | 1µl |
| Sample lysate | xµl |
| DNase-Free ddH ₂ O | (9-x)µl |

PCR 反应条件

| Step | Temp | Time | Cycles |
|------|---------|---------------|---------|
| 1 | 94°C | 5min | 1 |
| 2 | 94°C | 10sec | } 35-40 |
| 3 | 55-65°C | 20sec | |
| 4 | 72°C | xmin(2kb/min) | |
| 5 | 72°C | 5min | 1 |

琼脂糖凝胶电泳检测结果

问题分析指南

以下针对斑马鱼直接 PCR 系列试剂盒在实验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：028-83360257 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，下面就分别对使用斑马鱼直接 PCR 系列试剂盒可能会遇到的问题进行分析。建议在直接 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。

正对照、待测样本均无条带

1. PCR 反应体系或反应条件不合适。

建议：使用梯度 PCR 摸索 PCR 最佳反应条件。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2x 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。

3. 引物设计问题。

建议：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

1. PCR 条件没有使用正确。

建议：请仔细确认 2x PCR Mix 的类型，对应相应的 PCR 条件进行 PCR 扩增。

2. 加入组织裂解液过量。

建议：增大反应体系，或减少裂解液的用量。

3. 样本裂解混合液保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。

建议：裂解液可在 4℃保存 2-3 天，尽量使用新制备的裂解液混合液进行 PCR。

4. 模板加入量不适合。

建议：在反应体系 10-20%范围内优化模板加入量。反应效性能较差时，可以降低模板浓度调节到低于 10%的范围。

5. PCR 循环数不足。

建议：适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。因为模板复杂，一般 PCR 反应要比用纯化的 DNA 模板多 5-10 个循环为佳。

非特异性扩增

1. 退火温度偏低。

建议：适当提高退火温度。或对退火温度做一个梯度摸索。

2. PCR 循环数过多。

建议：适当降低循环次数，推荐在 35-40 循环为佳。

3. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

4. 模板加入量过多。

建议：将模板加入量控制在 10-20%。反应效性能较差时，可以降低模板浓度调节到低于 10%的范围。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：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。

2. 样本间交叉污染。

建议：每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口浸入 2% 的次氯酸钠溶液中，反复涮洗，然后用干净的纸巾擦干残液。

3. PCR 产物污染。

建议：如果实验室检测同类型样本多，最好使用 UNG 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

中国 ● 福际

World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

