

AmPure Tissue DNA Kit

(快速从组织样品中制备 DNA 用于 PCR)

简介

Magen 公司的 AmPure 产品系列采用独特的溶液系统，可快速地从各种生物样品中快速制备 DNA，用于 PCR。该系统只需对样品进行简单处理，无需抽提纯化，因而可在移液工作站中进行高通量自动化处理。得到的裂解液可直接用于各种 PCR，对 Taq 酶和反应液无特别要求。AmPure Tissue Kit 含快速制备 DNA 的溶液，适合从各种动物样品中快速制备 DNA，用作 PCR 的模板。AmPure Tissue Plus 含有快速制备 DNA 的溶液和 2 x Taq MasterMix (含溴酚蓝)。Taq MasterMix 含有甘油和溴酚蓝，可直接上样。

组成

AmPure Tissue DNA Kit

产品成分	D7101-01	D7101-02	D7101-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
DLB Buffer	11 ml	55 ml	110 ml
Proteinase K	11 mg	52 mg	110 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	3 ml	6 ml
IRB Buffer	11 ml	55 ml	110 ml

AmPure Tissue DNA Plus Kit

产品成分	D7102-01	D7102-02	D7102-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
DLB Buffer	11 ml	55 ml	110 ml
Proteinase K	11 mg	52 mg	110 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	3 ml	6 ml
IRB Buffer	11 ml	55 ml	110 ml
Taq MasterMix	2 ml	7 ml	14 ml
dH ₂ O	2 ml	7 ml	14 ml

保存条件

试剂盒可保存 2-8°C。Taq MasterMix 建议分装保存于 -20°C。Proteinase K 溶解后，保存于 -20°C。反复冻融 Proteinase K 和 Taq MasterMix 会影响实验结果。

准备条件

- 灭菌的离心管
- 灭菌的剪刀和镊子
- 95°C 水浴锅
- 55°C 水浴锅
- 加入适量 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉，使其终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡溶解，保存于 -20°C

Section A: DNA 快速制备步骤

第一次使用本试剂盒时，请仔细查看 DLB Buffer 中是否有结晶析出，若出现结晶，请将 DLB Buffer 于室温放置或 37°C 水浴重新溶解结晶物。

方案 A: 从小鼠尾巴、动物组织、头发或唾液制备 DNA

1. **吸取 100µl DLB Buffer 和 5µl Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。**
Buffer DLB 与 Proteinase K 可预先混匀，混匀液在室温可保存 2 小时。
2. **样品处理：**若处理多样本时，用 70%乙醇清洗剪刀或镊子。
 - **新鲜或冻藏鼠尾巴：**切取 0.5-1cm 鼠尾巴并转移到裂解液中。涡旋或吸打混匀。确保样品浸泡在裂解液中。
 - **动物组织：**切取 2-10mg 组织样品并转移到裂解液中。涡旋或吸打混匀。确保样品完全浸泡在裂解液中。
 - **发根：**切除头发的其它部分，把发根转移到裂解液中。涡旋或吸打混匀。确保样品完全浸泡在裂解液中。
 - **唾液：**转称 10µl 唾液到裂解液中。涡旋或吸打混匀。
3. 55°C 水浴 10~60 分钟。
大部分组织可能不能被消化，这是正常现象。该方法得到的 DNA 已经足够几十至百次的 PCR 反应。若需获得更多 DNA，第二步时对样品进行匀浆，或尽量将样品剪切成小碎片。
4. 95°C 水浴 3 分钟。
5. **加入 100µl IRB Buffer 至裂解液中，** 涡旋混匀。
6. 把样品保存于 4°C 或取 1-4µl 抽提液用于 PCR。样品可在 4°C 保存 6 个月。若样品需要长期保存，建议于 10,000 x g 离心 2 分钟，转移上清液新的离心管中，保存于 -20°C。

方案 B: 从口腔拭子中制备 DNA

1. 用拭子收集口腔细胞，并让其干燥。
由于裂解液用量不大，推荐使用发泡型的拭子，以减少溶液的损失。使用棉质或涤纶类的拭子会引起裂解液的损失，需酌情加大溶液的用量。
2. 吸取 200 μ l DLB Buffer 和 5 μ l Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。
Buffer DLB 与 Proteinase K 可在 2 小时内预先混匀。
3. 把拭子转移至裂解液中，室温放置 2 分钟。转动拭子 10 次，提起拭子紧贴管壁转动收集拭子上残留的裂解液。
4. 室温放置 10 分钟。
5. 95 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟。
6. 加入 200 μ l IRB Buffer 至裂解液中，涡旋混匀。
7. 把样品保存于 4 $^{\circ}$ C 或取 1-4 μ l 粗提液用于 PCR。长期保存时，-20 $^{\circ}$ C 保存。

Section B. PCR 扩增

1. 按下表在冰上配制 PCR 反应液：

试剂	体积
灭菌水	~ μ l
2 x Taq MasterMix	12.5 μ l
上游引物	~ μ l
下游引物	~ μ l
DNA 抽提液	1-4 μ l
总体积	25 μ l

2. 混匀；
3. 按下表设定 PCR 仪的程序；

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94 $^{\circ}$ C	3 分钟	1
变性	94 $^{\circ}$ C	0.5-1 分钟	30-35
退火	45-68 $^{\circ}$ C	0.5-1 分钟	循环
延伸	72 $^{\circ}$ C	1-2 分钟	
最后延伸	72 $^{\circ}$ C	10 分钟	1
保存	4 $^{\circ}$ C	For ever	

4. 当 PCR 预热上 94 $^{\circ}$ C 时，暂停 PCR 仪，把样品放入 PCR 仪中，立即进行扩增。
5. 反应结束后，取 3-5 μ l PCR 产物上样于 1.5-2% 琼脂糖凝胶上电泳分析结果。

Section C. 常见问题回答

● 扩增条带很弱或没有？

1. 样品中含有大量的抑制因子：用 1:1 DLB Buffer/IRB Buffer 稀释 DNA。若需验证是否存在抑制因子，可 DNA 粗制液加入 100-500 个拷贝的已知的基因模块，再进行 PCR。
2. 裂解不够：使用研磨杵对样品进行匀浆，延长 55 $^{\circ}$ C 的水浴时间；
3. PCR 参数设计不够合理；改变退火温度，延伸时间，延长循环数等；

● 组织样品没有被消化？

该方法并不要求消化所有的样品。但若需要提高 DNA 的产量，可对样品进行匀浆和延长 55 $^{\circ}$ C 的水浴时间来提高消化效果，提高 DNA 的得率。

● 口腔拭子吸掉了所有的消化液

由于该方法反应液较少，采用棉质或涤纶的拭子可能会吸掉很多消化液。我们建议尽量采用发泡质的拭子以减少裂解液的损失。处理棉质或涤纶拭子，可加入 DLB Buffer 至 300 μ l。

● 扩增条带不特异？

1. 采用热启动 Taq 酶，以提高特异性；
2. 若使用 Taq MasterMix，必须在冰上配制反应液，并待 PCR 仪升温至 94 $^{\circ}$ C 后，再把 PCR 反应液转移至 PCR 仪中，以减少非特异性的扩增。
3. 用 Touchdown PCR 技术，减少非特异性的扩增。