



# Direct DNA Amplification Kit

## 快速DNA直扩试剂盒

Cat. No. CW0557

### 产品简介

本试剂盒包含快速组织裂解及扩增试剂，样本预处理试剂用于从鼠尾、组织、叶片、种子等多种样本中快速释放基因组DNA并直接用于普通PCR扩增，具有较强的样本兼容性。

本产品无需进行复杂的DNA抽提步骤，各种动植物组织样本只需经过简单的裂解即可作为PCR扩增模板。2×Direct Amplification Mix(Dye)是由高效热启动DNA Polymerase、独特的延伸因子、dNTPs以及高性能稳定剂和增强剂组成的预混体系，扩增速度可达1 s/kb，PCR反应体系中只需加入引物和模板即可直接进行扩增，降低了试剂、模板等的交叉污染概率，提高结果的可重复性。

2×Direct Amplification Mix (Dye)中含有电泳指示剂，PCR反应结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，方便操作。本试剂盒适用于小鼠转基因检测、小鼠基因分型、动植物直扩、血液直扩、菌落直扩等。

**保存条件：** -20±5℃长期保存；2-8℃可保存一个月。

### 产品内容

Component	CW0557S 80 rxns	CW0557M 400 rxns
DNA Extract Solution A	5 mL	25 mL
DNA Extract Solution B	5 mL	25 mL
2×Direct Amplification Mix (Dye)	1 mL	5×1 mL

## 操作步骤

### 样本预处理

1. 根据不同的样本类型，按照下表准备相应的样本用量。
2. 将样本加入到PCR管或1.5 mL离心管中，加入下表推荐体积的 Solution A，混匀震荡20 s，使样本完全处于液面以下，并按照下表推荐的处理方法，放置于PCR仪中加热处理或金属浴中振荡孵育。
3. 样本充分裂解后，加入下表推荐体积的 Solution B，并涡旋震荡30 s。
4. 处理后的样本如不能立即进行下一步试验，可在4°C存放2小时。

样本类型	样本用量	Solution A	处理温度及时间	Solution B
小鼠组织	鼠尾长度1-3 mm 鼠耳直径1-3 mm 鼠趾1-2个	50 $\mu$ L	95°C 5-10 min	50 $\mu$ L
植物叶片、嫩芽	直径2-5 mm	50 $\mu$ L	95°C 5-10 min	50 $\mu$ L
种子	直径2-3 mm /重量2-5 mg	50 $\mu$ L	95°C 5-10 min	50 $\mu$ L
石蜡切片	直径10 $\mu$ m大小, 2-3张	200 $\mu$ L	95°C 5-10 min	200 $\mu$ L

#### 注意:

根据实验条件需求，可以扩大或减小样本用量，并等比例增加Solution A及Solution B用量。有的样本（如血液、血片、动物细胞和唾液等）不需裂解处理，可直接进行扩增。每个反应（25  $\mu$ L体系）用量控制在血液<2  $\mu$ L、血片直径<2 mm，动物细胞<2000个，唾液<2  $\mu$ L，如需加入更大用量，建议先按照上述操作进行裂解后再扩增。

### PCR扩增

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化；组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20°C或4°C保存。

#### 1. PCR反应体系

组分	25 $\mu$ L反应体系	终浓度
2 $\times$ Direct Amplification Mix (Dye)	12.5 $\mu$ L	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	0.5-1 $\mu$ L	0.2-0.4 $\mu$ M
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	0.5-1 $\mu$ L	0.2-0.4 $\mu$ M
Template DNA	1-2 $\mu$ L	适量
ddH <sub>2</sub> O	up to 25 $\mu$ L	/

注意：可等比例放大或缩小反应体系，引物浓度请以终浓度0.2-0.4  $\mu$ M作为设定范围的参考。

## 2. PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	30 s-3 min <sup>1)</sup>	1
变性	98°C	10 s	} 30-35个循环 <sup>4)</sup>
退火	引物T <sub>m</sub> +3°C <sup>2)</sup>	10 s	
延伸	72°C	1-10 s/kb <sup>3)</sup>	
终延伸	72°C	3-5 min	1
保存	4-12°C	∞	

### 注意:

- 1) 预变性: 质粒DNA、λDNA、简单基因组DNA等模板的预变性时间可设置为30 s-1 min, 对于粗样品、高GC、人基因组等复杂的模板, 预变性时间可延长至3 min。
- 2) 退火: 2×Direct Amplification Mix (Dye)中含有较高离子浓度, 反应退火温度可设置高于理论引物T<sub>m</sub>值2-3°C, 如无法得到理想的扩增效率时, 可梯度改变退火温度, 进行优化; 发生非特异性反应时, 适当提高退火温度。
- 3) 延伸: 根据其目的片段长度设置延伸时间, 简单片段或 < 5 kb片段设置1-5 s/kb, 对于长片段扩增或复杂模板可设置为5-10 s/kb。
- 4) 循环数: 可根据扩增产物的下游应用设定循环数, 如果循环次数太少, 扩增量不足, 循环次数太多, 错配几率会增加, 所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。

**结果检测:** 反应结束后取5 μL反应产物, 直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

## 常见问题与解决方案

1. 无扩增产物或扩增产物浓度低
  - 1) 可适当提高引物浓度;
  - 2) 设置梯度退火, 找到合适退火温度;
  - 3) 适当增加延伸时间或增加PCR循环数;
  - 4) 调整模板使用量或重新裂解。
2. 非特异较多或条带弥散
  - 1) 尝试提高退火温度;
  - 2) 适当降低引物浓度;
  - 3) 减少循环数;
  - 4) 调整模板使用量;
  - 5) 优化引物设计。