



版本号：202410V01

DNALyse Amplification Kit

快速DNA提取扩增试剂盒

目录号：CW0556S (50 Preps)
CW0556M (200 Preps)

保存条件：Buffer SA、2× PCR MasterMix -20℃，其他组分室温（15-30℃）。

产品内容

Component	CW0556S 50 Preps	CW0556M 200 Preps
Buffer SA	15 mL	50 mL
2×PCR MasterMix	1 mL	4×1 mL
Proteinase K	12.5 mg	4×12.5 mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25 mL	2×1.25 mL

产品简介

本试剂盒采用独特的缓冲体系, 包含了快速制备基因组DNA和PCR扩增的所有试剂, 适用于从各种动植物组织、细菌中一步提取基因组DNA并用于PCR扩增。整个提取过程无需液氮研磨, 无需有机溶剂抽提, 无需无水乙醇沉淀, 提取的DNA质量稳定。

本试剂盒提供的2× PCR MasterMix是一种兼容性强的PCR试剂, 能够高效特异扩增DNA样品, 该试剂包括DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR反应增强剂等。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点, 特别适合于高通量的筛选。2× PCR MasterMix含有电泳指示剂, PCR反应结束后可直接进行琼脂凝胶电泳。

实验前准备及重要注意事项

- 1. 向Proteinase K中加入指定用量的Proteinase K Storage Buffer使其溶解, 终浓度为20mg/mL, -20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置, 避免反复冻融, 以免影响其活性。

Proteinase K	12.5mg
Proteinase K Storage Buffer	0.625mL

- 2. 使用前请检查Buffer SA是否出现结晶或沉淀, 如有结晶或沉淀出现, 请将Buffer SA于56℃水浴重新溶解。
- 3. 本产品提供的 PCR MasterMix为2×, 使用时需加入模板和引物, 并加入RNase-Free Water补足体积, 使其浓度为1×即可进行反应。

使用方法

- 1. 取材:
植物材料: 取约**10mg**样本于离心管(自备)中;
动物材料: 取约**10mg**样本于离心管(自备)中;
菌体: 取生长状态良好的菌液**200-800μL**于离心管(自备)中, 收集菌体。简单的细菌样本也可直接进行菌液PCR, 取1-4μL菌体作为模板直接加入PCR反应体系。
- 2. 加入**200μL Buffer SA**, 涡旋混匀。

注意: 如果是植物叶片和动物组织, 应尽量用研磨杵研磨; 如果是植物种子, 应事先破碎并研细; 细菌、1-3mm鼠尾样本可直接涡旋裂解。

3. 加入4μL Proteinase K, 混匀, 56℃孵育10-30分钟, 95℃处理5-10分钟。
- 注意: : 1) 如果为动物组织样本, 可适当延长56℃孵育时间至30-60分钟; 如有未完全消化的任何组织, 应在下一步离心后尽量彻底去除。
- 2) 如样本量大, 可根据样本数量进行预混 Buffer SA及Proteinase K使用。
4. 13,000rpm (~17,900×g), 离心5分钟。
5. 转移上清至新的离心管(自备)中, 直接用于PCR扩增, 或4℃或-20℃保存裂解产物。
6. PCR扩增:
- 1) PCR反应体系:

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。

试剂	25μL体系	终浓度
2×PCR MasterMix	12.5 μL	1×
Forward Primer, 10 μM	1 μL	0.4 μM
Reverse Primer, 10 μM	1 μL	0.4 μM
Template DNA	2-4 μL	适量
RNase-free Water	up to 25 μL	

注意: 1) 引物浓度请以终浓度0.2-0.6 μM作为设定范围的参考。

2) 反应体系可根据需要等比例放大或缩小。

2) PCR反应条件:

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	3 min	
变性	95℃	30 s	} 30 - 35个循环
退火	根据引物Tm值设定	30 s	
延伸	72℃	1-2 kb/min	
终延伸	72℃	5 min	

注意: 1) 一般实验中退火温度比扩增引物的溶解温度Tm低2-5℃, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 提高退火温度, 由此优化反应条件;

2) 延伸时间根据所扩增的片段大小设定, 本产品中所包含的DNA Polymerase的延伸效率为1-2kb/min;

3) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。循环次数太少, 扩增量不足; 循环次数多, 错配机率会增加, 非特异性背景严重。在保证产物得率的前提下, 应尽量减少循环次数。

3) 结果检测: 反应结束后取5μL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. 如出现无扩增产物或扩增产量低
 - 1) 可尝试降低模板投入量。
 - 2) 延长粗提过程56℃孵育时间, 提高DNA的释放量。
 - 3) 在理论引物T_m值的基础上降低退火温度(每次降低1-2℃, 也可设置引物退火梯度)。
 - 4) 增加PCR循环数。
2. 如非特异严重
 - 1) 尽量在冰上配置体系。
 - 2) 适当提高退火温度。
3. 裂解产物应避免反复冻融, 如使用频繁可将裂解产物分装后-20℃保存或暂放4℃保存。