

【产品概述】

Multi-sample Direct PCR Kit 是一款可以对血液、唾液、拭子样本、培养细胞、植物叶片、动物组织等样本进行直接 PCR 扩增,或同时对简单裂解处理后的粗提样本进行 PCR 扩增的试剂盒。本产品使用的经定向进化改造的 DNA 聚合酶对胍盐、尿素、EDTA、SDS 等常见 PCR 抑制剂具有超强的耐受能力。

试剂盒中的 2× Multi-sample Direct PCR Master Mix 含有除模板和引物外 PCR 扩增所需的所有组分,客户只需加入引物、血液/细胞等样本或经简单裂解处理后的粗提样本,并用超纯水补足体积便可快速构建 PCR 反应体系,极大简化了操作步骤并缩短实验时间。试剂盒还包括精心优化的 Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer,用于对直接扩增时效果不佳的复杂样本进行简单裂解以快速释放基因组 DNA,裂解后的产物可以直接用于 PCR 反应,无需复杂的纯化步骤。

试剂盒对 2 Kb 的目标片段有很好的免纯化直接扩增效果;当目标片段较长或对实验要求较高时,建议采用常规核酸纯化后再扩增的方案。

【产品组分】

组 分	M3DI01-01 (50T)	M3DI01-02 (200T)
2× Multi-sample Direct PCR Master Mix	500 μL	2×1 mL
Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer	5 mL	20 mL

【储存和运输】

干冰或冰上运输;收到产品后将 2× Multi-sample Direct PCR Master Mix 保存于-20℃,避免反复冻融;Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer 可以单独室温保存或与试剂盒一起冻存。



【操作步骤】

1. 样本处理

唾液：直接取 1 μL -2 μL 新鲜采集的唾液加入反应体系中进行扩增。

血液：可以直接以新鲜或冻存的抗凝血为模板进行 PCR 扩增，扩增体系可以耐受高达 40% 的血液样本，一般推荐血液用量为总反应体积的 5%~10%。吸取抗凝血时，应避免吸取血液凝块。扩增结束后反应管中产生褐色块状沉淀属于正常现象，可以离心后取上清进行电泳检测或 PCR 产物回收。若扩增效果不理想，请调整血液用量或更换品质更高的样本。

培养细胞：细胞培养液短暂离心后弃上清，用适量无菌水重悬细胞，取 1 μL 重悬液进行扩增。反应体系中细胞总数在 1×10^5 时扩增效果较好。尽量去除培养基避免其对扩增产生影响。

口腔上皮细胞（拭子样本）：使用口腔拭子正常取样后，将细胞重悬在 200~500 μL 无菌水中，直接取 1 μL 样本进行扩增。如果扩增条带较淡，可以缩小重悬用的无菌水的体积、取样时多刮取几次、或适当增加扩增时的模板用量。

植物叶片：尽量使用幼嫩叶片，可根据叶片来源、幼嫩程度、目标片段长短等选择直接扩增法、研磨处理法或加热裂解法等。

直接扩增法：用干净的刀片切取或用移液器枪头戳取 1~3 mm^2 的幼嫩叶片，放入含配制好反应体系的 PCR 管中，确保叶片全部浸入 PCR 反应液，直接放入仪器进行扩增。将叶片尽量切碎，或使用枪头、研磨棒等挤压或研磨叶片有助于获得更好的扩增结果。

研磨处理法：取直径 5~10 mm 的幼嫩叶片放入研磨管中，加入适量研磨珠和 50~100 μL Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer，使用研磨仪进行细胞破碎，短暂离心并取 1 μL 上清进行 PCR 扩增。

加热裂解法：取直径 5~10 mm 的幼嫩叶片（尽量切碎）加入到含有 50~100 μL Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer 的 PCR 管或离心管中，95 $^{\circ}\text{C}$ 加热裂解 10 min。较难裂解的植物样本可适当延长裂解时间。加热裂解后溶液一般呈绿色，震混后瞬时离心，取 1 μL 上清进行 PCR 扩增。

动物组织：将 10 mg（约 1~2 mm^3 ）的动物组织（肝脏、心脏、脾、肌肉、鼠尾等）尽量切碎后置于含 50 μL Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer 的离心管中，【可选】加入 1 μL 浓度为 20 mg/mL 的蛋白酶 K（自备），轻轻涡旋混匀使组织分散在裂解液中，55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10~30 min（根据组织消化情况调整时长，孵育结束仍有部分组织残留为正常现象）；若裂解时加入蛋白酶 K，孵育结束后需 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 使蛋白酶 K 失活；将样本 12,000 rpm 离心 1 min，取 1 μL 上清进行 PCR 扩增。



2. 推荐的反应体系

组 分	推荐用量	推荐终浓度
2× Multi-sample Direct PCR Master Mix	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
Sample / Crude Lysate	1 uL*	-
ddH ₂ O	to 20 μL	-

* 血液、唾液等液体样本以及裂解后的粗提样本一般占总体积的 5%~10%；对植物叶片等固体样本进行扩增时，将样品尽量切碎后直接加入配制好的 20 uL 反应体系中。

3. 扩增程序

步 骤	温 度	时 间	循环数
Pre-denaturation	95°C	5 min	1
Amplification	95°C	10 sec	35
	55°C*	10 sec	
	72°C	10~20 sec/kb	
Extension	72°C	5 min	1
Hold	10°C	Hold	1

* 退火温度可以根据引物的 T_m 值进行相应调整。

注意事项：

- ☑ 尽量在冰上配制 PCR 体系以减少非特异性扩增，提高扩增成功率。
- ☑ 预变性温度 95°C 或者 96°C，时间 5 min 左右，不要降低温度或缩短时间。
- ☑ 对于难以扩增的样本，可尝试在 Multi-sample Direct PCR Lysis Buffer 中加入终浓度为 2% 的β-巯基乙醇或 10 mM 的 DTT。
- ☑ 高 GC 含量模板扩增时可以加入终浓度 5% 的 DMSO，或加入甜菜碱、甲酰胺等增强剂。
- ☑ 直接裂解或研磨处理后的样本请尽快用于扩增反应，或离心后将上清液于-20°C 保存。

3





**SERVE SCIENCE
SEE THE FUTURE**