

天
净
沙
系
列

CAT#:220325-100
低温运输, -20℃保存

天净沙

酵母菌落 PCR 试剂盒

Yeast Colony PCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址: www.tjs.bio; 电话: 400-1078566; 电邮: order@tjs.bio

产品及特点	菌落 PCR 是筛选重组子的有效方法，可以使质粒鉴定过程从两天缩短到几小时。但如果宿主是酵母，其菌落 PCR 的难点则是破壁，因为酵母的细胞壁比细菌坚韧许多。本产品是基于玻璃珠破壁方法而开发的酵母菌落 PCR 产品，它具有下列特点： 1. 破壁效率高，甚至可以用于野生型酵母。 2. 既可用酵母菌落，也可用酵母培养液。 3. 条件温和，菌落 PCR 可以扩增长达 3kb 的 DNA。 4. 既可小规模筛选，也适用于大规模筛查。 5. 高灵敏度，既可用于扩增酵母质粒，也可以用于扩增酵母基因组 DNA。 6. PCR 反应液中含有惰性电泳染料，反应后可直接上样电泳，不需另加上样液。 7. 处理过的酵母菌落样品低温长期保存后仍能用于 PCR 筛查。 8. 本产品足够 100 次 60uL 体系的酵母菌落 PCR (细菌菌落 PCR 需要用另一款产品，编号 221139)。																							
规格及成分	本产品采用 5 孔盒包装 <table><tr><td>成份</td><td>编号</td><td>规格</td><td>包装</td></tr><tr><td>酵母破壁液</td><td>220321a</td><td>2 mL</td><td>2.0mL 绿盖管</td></tr><tr><td>酸洗玻璃珠，400-600um</td><td>220126</td><td>3 g</td><td>2.0mL 本色管</td></tr><tr><td>2×PCR MasterMix (菌落筛选专用)</td><td>11-220321b</td><td>1.5 mL×2</td><td>1.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>220321sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成份	编号	规格	包装	酵母破壁液	220321a	2 mL	2.0mL 绿盖管	酸洗玻璃珠，400-600um	220126	3 g	2.0mL 本色管	2×PCR MasterMix (菌落筛选专用)	11-220321b	1.5 mL×2	1.5mL 红盖管	使用手册	220321sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装																					
酵母破壁液	220321a	2 mL	2.0mL 绿盖管																					
酸洗玻璃珠，400-600um	220126	3 g	2.0mL 本色管																					
2×PCR MasterMix (菌落筛选专用)	11-220321b	1.5 mL×2	1.5mL 红盖管																					
使用手册	220321sc	1 份	无																					
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																							
自备试剂	酵母菌落、模版专一性引物、TE 缓冲液（如果 DNA 不能马上使用）。																							
使用方法	一、酵母破壁 1. 如果有 N 个样本，则标记 N+2 个 1.5 mL 的塑料离心管，N 个用于样本，一个用于阳性对照 PC（Positive Control，确认有质粒阳性的样本），一个用于阴性对照 NC（Negative Control，可以用水代替）。 2. 在每个管中加入 20uL 酵母破壁液。 3. 挑入一个新鲜酵母菌落（芝麻大小即可）或 2uL 酵母饱和菌液。 4. 加入体积跟酵母破壁液相当的酸洗玻璃珠（重量在 20-30mg）。 5. 涡旋震荡 3 分钟。 6. 常温 10,000rpm 离心半分钟后可以直接取上清作为模板立即进行 PCR。 如果不立即进行 PCR，需将上清全部转移到新的离心管中（至少可以取出																							

15uL), 再加入等体积的自备 TE 缓冲液, 放-20℃待用。TE 缓冲液中的 EDTA 可以抑制样本中残留 DNase 的活性, 可以使 DNA 的放置时间更长。

二、PCR 扩增

7. 在一个 1.5mL 的预冷塑料离心管中分别加入下列预冷成份并充分混匀, 得到 PCR 预混液并放冰上待用。由于有 N+2 个样本, 所以配制时多加一个, 按 N+3 计算:

成分	加入量
自备超纯水	27 uL × (N+3)
自备 PCR 引物 F, 10uM	1 uL × (N+3)
自备 PCR 引物 R, 10uM	1 uL × (N+3)
2×PCR MasterMix (菌落筛选专用)	30uL × (N+3)
合计	59 uL × (N+3)

8. 将上步得到的预冷 PCR 预混液按 59uL/管分装到 N+2 个标记并且预冷的 PCR 管中。
9. 将第 6 步制备的 N+2 个样品各取 1uL 加入上步加有 59uL 混合液的 PCR 管中。PC 样到 PC 管, NC 样到 NC 管, 1 号样品加入到 1 号 PCR 管中, 以此类推。由于裂解液含大量 PCR 抑制物, 样本用量不要超过 1.5uL, 否则样本加得越多, PCR 越容易被抑制。
10. 将 N+2 个预冷的 PCR 管快速放入 PCR 仪器中进行扩增, PCR 温度参数根据引物和模板情况由客户自己预先确定。
11. PCR 结束后直接取 10 uL 电泳直接进行琼脂糖电泳分析。本试剂盒提供的 PCR MasterMix (菌落筛选专用) 中已经含有电泳示踪剂和促沉剂, 故可以直接上样。橙黄色电泳染料的泳动速度对应于 50 bp 的 oligo, 蓝色电泳染料的泳动速度对应于 3-5kb 的 DNA。
12. 如果阴性对照 NC 有预期大小的扩增产物, 则无论阳性对照 PC 和 N 个样本的结果如何, 整个实验无效。说明环境污染, 需要解决污染问题再继续。
13. 如果阳性对照 PC 没有预期大小的片段, 且没有任何样本呈现阳性, 则很可能是试剂、程序、引物、仪器等有问题, 需要解决问题后再继续。如果有任何一个样本呈现阳性 (不包括阴性对照), 则实验有效, 可以继续分析每个样品。
14. 如果阳性对照有预期大小的片段, 阴性对照没有, 则整个实验有效。可以分析每个样品。每个样品如果有预期大小的扩增产物, 则初步判断为阳性。如

	果没有，则判断为阴性。 15. 对阴性样本，可以用超纯水将其稀释 10 倍、百倍、千倍、万倍 4 个稀释度，然后一起再进行 PCR 检测，如果某个稀释度的样本出现预期扩增产物，则测试时需要先将样本稀释到该稀释度后再测。 16. 可以将阳性样品对应的菌落再挑出来进行培养并进行进一步的分析。
关联产品	细菌菌落 PCR 试剂盒