天净沙系列

CAT#:220325

低温运输，-20℃保存

# 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 3 kb 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 60 μL 体系的酵母菌落 PCR（细菌菌落 PCR 需要用另一款产品，编号编号 221173）。

## 规格及成分

本产品采用五孔盒包装

| 成　份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 酵母破壁液 | 220325a | 2 × 1 mL | 1.5 mL 绿盖管 |
| 2×PCR MasterMix（菌落筛选专用） | 11-220325b | 2 × 1.5 mL | 1.5 mL 红盖管 |
| 酸洗玻璃珠 400-600 μm | 220126 | 3 g | 2.0 mL 本色管 |
| 使用手册 | 220325sc | 1 份 | 1 份 |

## 运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

## 自备试剂

酵母菌落，模版专一性引物，TE 缓冲液。

## 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 20 μL 酵母破壁液。
3. 挑入一个新鲜酵母菌落（芝麻大小即可）或 2 μL 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 20-30 mg）。
5. 涡旋震荡 3 分钟。

6. 常温 10000 ×g 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离心管中（至少可以取出 15 μL）， 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 1.5 mL 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:

| 成份 | N+2 个样品管 |
|---|---|
| 自备超纯水 | 27 μL × (N+3) |
| 自备 PCR 引物 F，10 μM | 1 μL × (N+3) |
| 自备 PCR 引物 R，10 μM | 1 μL × (N+3) |
| 2×PCR MasterMix<br>（菌落筛选专用） | 30 μL × (N+3) |
| 合计 | 59 μL × (N+3) |

8. 将上步得到的预冷 PCR 预混液按 59 μL/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 1 μL 加入上步加有 59 μL 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 1.5 μL，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 μL 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 DNA，蓝色电泳染料的泳动速度对应于 3-5 kb 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。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。<br>13. 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。<br>14. 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。<br>15. 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 |

20240123wmx