

酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)

产品货号: BA3162

产品规格: 100T/500T

产品简介:

酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)是一种非常便捷的用于酿酒酵母、毕赤酵母等菌株在质粒转化后阳性克隆菌落的PCR筛选和鉴定的试剂盒。本试剂盒提供了Yeast Lysis Buffer用于破坏酵母细胞壁,并提供了Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)用于进行PCR扩增。Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)是含有紫红色和黄色染料(电泳位置分别约2.5kb和10bp)的2倍浓度的PCR预混液,含有2× Taq DNA Polymerase、2× PCR Buffer、2× dNTP和2× Loading Buffer等,用户只需加入酵母菌落裂解液、引物和水即可进行PCR扩增,并且扩增完后可以直接上样电泳。同时提供了Yeast Lysis Buffer在PCR反应前对酵母进行有效预处理,可以充分释放酵母DNA,能确保有效进行酵母菌落PCR,从而大大缩短酵母转化后阳性克隆鉴定的时间,提高实验效率。

酵母细胞的细胞壁主要成分为多糖(85%-90%)和蛋白质(10%-15%),其中多糖是由甘露聚糖、 β -葡聚糖和少量的几丁质等组成,处于细胞壁内层的 β -葡聚糖与几丁质共价相连,起到细胞骨架的作用;而外层的甘露聚糖与中层蛋白质中的丝氨酸或苏氨酸以O-糖苷键相连接,形成的甘露糖蛋白覆盖于细胞表面,给予酵母细胞一定的韧性。酵母细胞壁独特的结构致使其DNA难以被简单的PCR加热过程所释放,导致很多将酵母直接作为模板进行PCR检测的试剂盒成功率都比较低。

本试剂盒使用非常便捷。本试剂盒中提供的Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)已经含有所有的通用组分,用户只需自备引物和水即可对酵母菌落进行PCR扩增。它大大简化了PCR操作,使操作更加快捷,也减少了PCR操作过程中可能导致的污染;同时Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)中已经包含了上样缓冲液组分,PCR扩增结束后即可直接上样电泳,无需添加上样缓冲液。

本试剂盒中提供了双色染料,便于电泳时观察电泳进程。本试剂盒中的Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)加入了紫红色和黄色的电泳示踪染料(整体呈现红色),其在浓度为1%琼脂糖胶中的迁移位置分别大约位于2.5kb和10bp处。PCR结束后可直接进行电泳检测,无需再添加上样缓冲液。紫红色和黄色示踪染料不会影响对相应DNA条带的观察和检测。

产品组成:

产品名称	100T	500T	保存条件
试剂(A): Yeast Lysis Buffer	1.1ml	5.5ml	2-8℃
试剂(B): Neutralization Buffer	1.1ml	5.5ml	2-8℃
试剂(C): Yeast Colony PCR Mix (Red, 2×)	1ml	1ml×5	-20℃

使用方法:

1. 酵母菌落的裂解

- 准备PCR管(例如PCR-1G 0.2ml优级PCR单管),每管中加入10 μ l Yeast Lysis Buffer。
- 用无菌吸头挑取0.2-1mm酵母单克隆至含10 μ l Yeast Lysis Buffer的PCR管中,吹打混匀或Vortex混匀,低速离心数秒使液体聚集在管底。

同时对于该菌落进行标记或同时接种该菌落到液体培养基或新的平板上。

注: 菌体过多可能会影响Yeast Lysis Buffer对酵母的裂解并影响后续PCR反应,菌体量通常不宜超过约2 μ l。

- 在PCR仪上95℃加热5分钟,以充分释放酵母的DNA。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- d. 加入10 μ l Neutralization Buffer，混匀，后续即可作为DNA模板用于PCR检测。
2. 酵母菌落PCR反应体系的设置：
 - a. 室温融解Yeast Colony PCR Mix (Red, 2 $\times$)，上下颠倒轻轻混匀后低速离心数秒。
 - b. 参考下表在冰浴上设置PCR反应体系：

试剂	使用量	最终浓度
Ultrapure water	7.4 μ l	
Primer mix (5 μ M each)	1.6 μ l	0.4 μ M each
Yeast Colony PCR Mix (Red, 2 $\times$)	10 μ l	1 $\times$
Total volume	19 μ l	

注：通常引物的终浓度为0.2 μ M时可获得良好的检测效果，也可以根据情况在0.1-1.0 μ M范围内调整引物的终浓度。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度。超纯水可以选购DNase/RNase-Free, Sterile Water。

- c. 吸取步骤1d准备好的DNA模板1 μ l至配制好的19 μ l PCR反应体系中，轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温低速离心数秒，使液体聚集在管底。
- d. 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖，则在管内滴入一滴石蜡油。
- e. 把设置好的PCR反应管置于PCR仪上，开始PCR反应。
3. PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

Step1(起始变性): 94 $^{\circ}$ C 3min; Step2(变性): 94 $^{\circ}$ C 30sec; Step3(退火): 55 $^{\circ}$ C 30sec
 Step4(延伸): 72 $^{\circ}$ C 1min/kb; Step5(循环): Go To Step2 for 30 cycles; Step6(最终延伸): 72 $^{\circ}$ C 10min
 Step7(临时保存): 4 $^{\circ}$ C forever

注 1：PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同，设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。

注 2：Step4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置，通常每kb产物的延伸时间为1分钟。例如PCR产物的长度为1kb，则延伸时间可以设置为1分钟，PCR产物的长度为2kb，则延伸时间可以设置为2分钟，以此类推。

注 3：对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应循环数一定要进行适当优化，使PCR反应没有达到平台期。

4. 结果检测

PCR结束后直接取5-10 μ l进行电泳检测，无需添加上样缓冲液。

注意事项：

1. 酵母菌落较难裂解，裂解时请注意吹打混匀或Vortex震荡混匀。
2. 由于PCR反应非常灵敏，可使目的基因扩增超过1000万倍，在设置PCR反应时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
3. 避免反复冻融本产品，多次反复冻融可能使产品性能下降。
4. 使用本产品前，一定要完全融化，并上下颠倒轻轻混匀后才能使用，并尽量避免产生气泡。
5. 超纯水推荐选购DNase/RNase-Free, Sterile Water。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

储存条件：-20 $^{\circ}$ C保存，至少一年有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com