

## 酵母菌落 PCR 试剂盒(碱裂解法)

货号: L7278

### 储存条件:

-20°C 保存, 至少一年有效。

Yeast Lysis Buffer 和 Neutralization Buffer 可以室温或 4°C 保存, 至少一年有效。

Yeast Colony PCR Mix (Blue, 2X) 尽量避免反复冻融。

### 产品组分:

组分	100T	500T
A. Yeast Lysis Buffer	1.1ml	5.5ml
B. Neutralization Buffer	1.1ml	5.5ml
C. Yeast Colony PCR Mix (Blue, 2X)	1ml	1ml*5

### 产品描述

兰博利德生产的酵母菌落 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 (Blue, 2X) 用于进行 PCR 扩增。Yeast Colony PCR Mix (Blue, 2X) 是含有蓝色和红色染料(电泳位置分别约 1.5kb 和 100bp) 的 2 倍浓度的 PCR 预混液, 含有 2X Taq DNA Polymerase、2X PCR Buffer、2X dNTP 和 2X 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、 $\beta$ -葡聚糖和少量的几丁质等组成, 处于细胞壁内层的 $\beta$ -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 (Blue, 2X) 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 (Blue, 2X) 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 (Blue, 2X) 加入了蓝色和红色染料的电泳示踪染料(整体呈现蓝色), 其在浓度为 1% 琼脂糖胶中的迁移位置分别大约位于 1.5kb 和 100bp 处。PCR 结束后可直接进行电泳检测, 无需再添加上样缓冲液。蓝色和红色示踪染料不会影响对相应 DNA 条带的观察和检测。

### 使用方法:

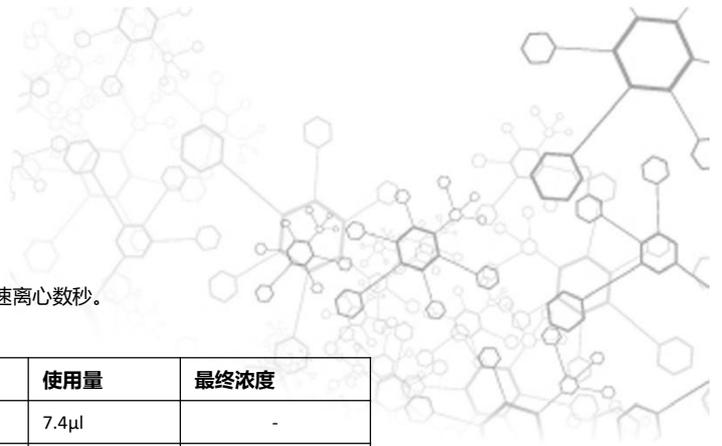
#### 1. 酵母菌落的裂解

- 准备 PCR 管(如兰博利德生产的 PCRG-1G 0.2ml 优级 PCR 单管), 每管中加入 10 $\mu$ l Yeast Lysis Buffer。
- 用无菌吸头挑取 0.2-1mm 酵母单克隆至含 10 $\mu$ 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 $\mu$ l。

- 在 PCR 仪上 95°C 加热 5 分钟, 以充分释放酵母的 DNA。
- 加入 10 $\mu$ 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:

- 室温融解 Yeast Colony PCR Mix (Blue, 2X), 上下颠倒轻轻混匀后低速离心数秒。
- 参考下表在冰浴上设置 PCR 反应体系:

试剂	使用量	最终浓度
ddH <sub>2</sub> O	7.4μl	-
Primer mix (5μM each)	1.6μl	0.4μM each
Yeast Colony PCR Mix (Blue, 2X)	10 μl	1X
Total volume	19 μl	-

注: 通常引物的终浓度为 0.2μM 时可获得良好的检测效果, 也可以根据情况在 0.1-1.0μM 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 D0055WJ (Lablead DNase/RNase-Free, Sterile Water)。

- 吸取步骤 1d 准备好的 DNA 模板 1μl 至配制好的 19μl 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。如果 PCR 仪没有热盖, 则在管内滴入一滴石蜡油(M8410 Mineral oil)。
- 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:

程序	温度	时间	循环
起始变性	94°C	3 min	30 cycles
变性	94°C	30 s	
退火	55°C	30 s	
延伸	72°C	30 s-1 min/kb	
终延伸	72°C	10 min	
	4°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: 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 5-10μl 进行电泳检测, 无需添加上样缓冲液。

### 注意事项:

- 酵母菌落较难裂解, 裂解时请注意吹打混匀或 Vortex 震荡混匀。
- 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。
- 避免反复冻融本产品, 多次反复冻融可能使产品性能下降。
- 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。
- 超纯水推荐选购 D0055WJ (Lablead DNase/RNase-Free, Sterile Water)。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

