

通用菌落 PCR 检测试剂盒

Cat. #: P8011, P8012

产品简介

本试剂盒利用 PCR 原理, 结合本公司的快速 DNA 聚合酶 (延伸速率 20s/kb), 设计适用性广的最佳引物, 优化 PCR 反应缓冲体系, 同时简化检测方法, 可用于各种常用 T 载体克隆的筛选检测。

产品组成

Component	P8011	P8022
2× FS™ Mix	500 µl	1 ml × 5
T-primer (10 µM)	50 µl	500 µl
超纯水	1 ml	1 ml × 10
说明书	1 份	1 份

活性定义

一个活性单位 (U) 指用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 72°C、30 min 内, 摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

保存条件

-20°C 保存。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测本试剂盒无宿主残余 DNA, 也无其他 DNA 污染, 能有效完成 PCR 扩增。

应用举例

1. 准备样品

将过夜培养的平板上的菌落编号后, 用灭菌的牙签挑取单克隆菌体的一部分至反应体系中; 或在 1.5 ml EP 管中分装 500 µl 含有相应抗生素的 LB 培养基, 并做好标记, 用无菌牙签提取单个菌落至上述培养基中, 37 振荡 (250-300rpm) 培养 4h, 取 1-2 µl 菌液用于扩增。

2. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分用量与添加顺序可调整:

Ordina	Component	Volume
I		(20 µl reaction volume)
1	2× FS™ Mix	10 µl
2	T-primer (10 µM)*	1 µl
3	菌体或菌液	1 µl
4	超纯水	To 20 µl

*包含了上下游引物, 扩增大小约为: 克隆片段+250 bp。

- 加入各组分后, 请用枪头反复吸吹几次, 充分混匀。
- 在一次配制多管需分装时建议按 (n+1) 的反应液量配制, 以确保分配时的耗损不会影响实验, 同时选择大于总体积的离心管便于混匀。
- 如需使用其他体积的 PCR 反应体系, 请按各组分比例缩减或增加各组分用量。
- 将混匀的各管短暂离心, 置于 PCR 仪中。

3. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
-------	-------------	------	------------------

Initial Denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	30 sec	30
Annealing	55℃	30 sec	
Extension	72℃	30 sec or 45 sec	
Final Extension	72℃	5 min	1

● 设定PCR程序时，请根据目的片段大小决定延伸时间，如果目的片段大小为500 bp时，延伸时间为15 sec；500 bp-1 kb，延伸时间20 sec；目的片段>1 kb时，延伸时间按20s/kb计算。

3. 分析结果

反应结束后取 2-5 μ l 反应产物与 loading buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。

注意事项

请严格按照说明书提供的实验体系及实验条件进行试验。

室温下 DNA 聚合酶有一定的活性，为避免发生非特异性扩增，请于冰上配置反应体系，并且最后添加 FS™ Mix 或模板 DNA。

挑取菌落时，应选择单菌落，不要挑取太多菌体，以免影响 PCR 结果。

部分适用 T 载体参考下表：

公司	T 载体
Promega	pGEM-T Vector
	pGEM-T Easy Vector
Takara	pMD18-T Vector
	pMD19-T Vector
	pMD20-T Vector
	pMD18-T Simple Vector
	pMD19-T Simple Vector
	pSIMPLE-18 <i>EcoR</i> V/BAP Vector
	pSIMPLE-19 <i>EcoR</i> V/BAP Vector
Tiangen	pGM-T 载体
	pBS-T 载体