



产品详情

大肠杆菌菌落直接 PCR 试剂盒

E. coli Colony Direct PCR Kit

产品货号	产品名称	保存条件	保质期
S17134	大肠杆菌菌落直接 PCR 试剂盒	-20℃	1 年

基本信息：

中文名称	大肠杆菌菌落直接 PCR 试剂盒
英文名称	E. coli Colony Direct PCR Kit
保存温度	-20℃ 勿反复冻融
有效期	1 年

产品简介：

1. 大肠杆菌菌落直接 PCR 试剂盒(E. coli Colony Direct PCR Kit)是一种使用特别便捷的含有蓝色和橙色染料(电泳位置分别约 4kb 和 50bp)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, 只需加入大肠杆菌菌落或菌落稀释物、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。本试剂盒主要适用于质粒转化大肠杆菌后阳性克隆的菌落 PCR 筛选和鉴定。

2. 本试剂盒经过反复优化, 确保直接挑取菌落进行 PCR 的扩增效果良好, 菌落的存在不会显著干扰 PCR 反应。本试剂盒中提供的 E. coli Colony Direct PCR Mix(Green, 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大肠杆菌菌落进行 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, 使 PCR 的重复性更好; 同时 E. coli Colony Direct PCR Mix(Green, 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。本试剂盒扩增效果好。本试剂盒可以扩增出长达 8kb 的片段, 但通常更适合用于扩增 2kb 以下的 DNA 片段。本试剂盒中提供了双色染料, 便于电泳时观察电泳进程。本产品中加入了蓝色和橙色的电泳示踪染料(整体呈现绿色), 其在浓度为 1% 琼脂糖胶中的迁移位置分别大约位于 4kb 和 50bp 处。PCR 结束后可直接进行电泳检测, 无需再添加上样缓冲液。蓝色和橙色示踪染料不会影响对相应 DNA 条带的观察和检测。本产品稳定性高。经测试, 本试剂盒反复冻融 15 次后对 PCR 的扩增效果无显著影响。

操作步骤(仅供参考):

1. 菌落直接 PCR 反应体系的设置

- 室温融解 E. coli Colony Direct PCR Mix(Green, 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	最终浓度	体积
双蒸水或 Milli-Q 水	-	8.4μl
引物混合物(10μM)	0.8μM	1.6μl
E. coli Colony Direct PCR Mix(Green, 2X)	1X	10μl
总体积	-	20μl

注意：

(a) 考虑到 PCR 产物连接涂板的时候，有部分引物可能会污染菌落，通常做菌落 PCR 的时候，推荐使用来自克隆载体上的通用引物进行 PCR 扩增。

(b) 通常引物的终浓度为 $0.2 \mu\text{M}$ 时可获得良好的检测效果，也可以根据情况在 $0.1\text{--}1.0 \mu\text{M}$ 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。

c. 对于要挑取的克隆在平板上做好标记，无菌吸头等挑取平板上对应的克隆，加入到上述预先配制好的 $20 \mu\text{l}$ PCR 反应体系中，轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。

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，则在管内滴入一滴矿物油 (ST275 Mineral oil)。

e. 把设置好的 PCR 反应管置于 PCR 仪上，开始 PCR 反应。

2. 菌落稀释后检测的 PCR 反应体系的设置

a. 室温融解 E. coli Colony Direct PCR Mix (Green, 2X)，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	最终浓度	体积
双蒸水或 Milli-Q 水	—	$5.4 \mu\text{l}$
引物混合物 ($10 \mu\text{M}$)	$0.8 \mu\text{M}$	$1.6 \mu\text{l}$
E. coli Colony Direct PCR Mix (Green, 2X)	1X	$10 \mu\text{l}$
总体积	—	$17 \mu\text{l}$

注意：

(a) 考虑到 PCR 产物连接涂板的时候，有部分引物可能会污染菌落，通常做菌落 PCR 的时候，推荐使用来自克隆载体上的通用引物进行 PCR 扩增。

(b) 通常引物的终浓度为 $0.2 \mu\text{M}$ 时可获得良好的检测效果，也可以根据情况在 $0.1\text{--}1.0 \mu\text{M}$ 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。

c. 挑取克隆至预先加入了 $10 \mu\text{l}$ 双蒸水或 Milli-Q 水的无菌离心管中，轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀。

d. 吸取步骤 2c 配制好的菌落稀释液 $3 \mu\text{l}$ 至步骤 2b 配制好的 $17 \mu\text{l}$ 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，使液体积聚于管底。

e. 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，则在管内滴入一滴矿物油 (ST275 Mineral oil)。

f. 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°C 3min

STEP2(变性): 94°C 30sec

STEP3(退火): 55°C 30sec

STEP4(延伸): 72°C 1min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30cycles

STEP6(最终延伸): 72°C 10min

STEP7(临时保存): 4°C forever

注意：

a. 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。

b. 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。

c. 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。

5. 菌落的后续使用

步骤 1 直接挑取的菌落，可以对平板适当培养后在标记的位置再次挑取克隆后进行扩增培养和质粒提取等；对于步骤 2 菌落稀释后进行 PCR 鉴定的情况，可以直接取阳性的菌液进行扩增培养和质粒提取等。

注意事项：

1. 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。
2. Taq DNA polymerase 在 PCR 过程中每个循环的出错几率约为 2.2×10^{-5} ，对于大于 1kb 的 DNA 片段的克隆推荐使用出错几率更低的 DNA 聚合酶，例如 Pfu DNA polymerase、Beyo Taq DNA polymerase 等。对于普通的 PCR 或 RT-PCR 进行定性或定量检测，Taq DNA polymerase 是最佳选择。
3. 尽管本产品经过 15 次反复冻融后仍具有和冻融前几乎相同的 PCR 扩增效果，但仍宜适当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. 我司生产的生化试剂如无特殊标注，基本为非无菌包装，若用于细胞实验，请提前做好预处理。需低温保存的产品，一旦配成溶液，请分装保存，避免反复冻融造成的产品失效。
6. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。
7. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
8. 实验结果可由多种因素影响，相关处理只限于产品本身，不涉及其他赔偿。

常见问题：

PCR 产物非常少或没有特异性条带。

1. 引物设计不佳是 PCR 过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点等后整条引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。
2. 待扩增片段 GC 含量偏高。GC 含量较高的情况下 PCR 会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高 GC 含量 DNA 片段的 GC-rich buffer，并相应地根据 GC-rich buffer 的要求或说明调整 PCR 反应参数的设置。
3. 长片段扩增。尽管 Taq DNA polymerase 可以扩增最长达 8kb 的 DNA 片段，但大多数时候比较适合扩增 2-3kb 以下的片段，更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的 DNA 聚合酶。
4. PCR 反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置 PCR 反应。
5. 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用 Touch down 等方法进行退火，通常采用从 65 $^{\circ}$ C 逐步缓慢降温到 55 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 的方法，使退火更加充分。
6. 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度 PCR 仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度 PCR 仪，则可以通过多次 PCR 反应摸索最佳的退火温度。
7. 延伸时间不足。可按照每 1kb 片段延伸 1 分钟进行设置，对于较难扩增的片段可以设置为每 1kb 片段延伸 1.5-2 分钟。
8. 待扩增片段 GC 含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至 95 $^{\circ}$ C 1min 甚至 95 $^{\circ}$ C 2-4min。
9. 在不同 PCR 仪上进行 PCR 反应，避免有时 PCR 仪出现问题。
10. 循环数不足，适当延长 PCR 的循环数。通常循环数最高不必超过 40，常用的循环数范围为 25-35。
12. 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。
13. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。

免责声明：本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话：13564444959

官网：www.followme-shop.com

地址：北京市海淀区东北旺西路 58 号尚科办公社区 C 区一楼



公众号

客服