

10× 菌落/菌液PCR增强剂

| | |
|----------|------------|
| PR304-01 | 1.5 ml |
| PR304-02 | 1.5 ml × 5 |

● 储存条件

室温保存；为方便使用可长期储存于4°C。

上海莱枫生物科技有限公司

www.lifefeng.com

电话：021-64810180 传真：021-54252754

技术支持：13817902990(上海)

● 产品简介

使用菌落或者菌液直接进行PCR时，由于细菌未有效裂解，质粒DNA未充分释放而出现假阴性。

10× 菌落/菌液PCR增强剂能促进细胞膜破裂释放质粒DNA，增加有效模板量，从而增强PCR敏感性。尤其适合用新鲜菌落或者菌液。

● 使用方法示例

1. PCR成分准备

将PCR试剂和引物室温解冻，上下翻转混合均匀，置于冰上。

2. PCR反应液配制(以20 μl PCR体系为例)

除了菌落或者菌液，其它PCR成分加样体积尽可能大于1 μl。如果多个样品同时进行PCR，能预混的成分尽可能预混后分装到各PCR管中。

使用2×Taq PCR Master Mix

| | |
|---------------------------|----------|
| 菌液 | ≤1 μl |
| 或者用枪头挑取单克隆，放入PCR体系，反复吹打数次 | |
| Primer1 (10 μM) | 0.5 μl |
| Primer2 (10 μM) | 0.5 μl |
| 2×Taq PCR Master Mix | 10 μl |
| 10× 菌落/菌液PCR增强剂 | 2 μl |
| 去离子水 | 补充至20 μl |

菌落/菌液PCR增强剂终浓度±30%不影响使用。为了方便使用，用去离子水将10×菌落/菌液PCR增强剂稀释为2×，替代去离子水。

使用Taq DNA Polymerase

| | |
|---------------------------|----------|
| 菌液 | ≤1 μl |
| 或者用枪头挑取单克隆，放入PCR体系，反复吹打数次 | |
| Primer1 (10 μM) | 0.5 μl |
| Primer2 (10 μM) | 0.5 μl |
| dNTPs (10 mM each) | 0.4 μl |
| 10× Taq Buffer | 2 μl |
| Taq DNA Polymerase | 0.4 μl |
| 10× 菌落/菌液PCR增强剂 | 2 μl |
| 去离子水 | 补充至20 μl |

菌落/菌液PCR增强剂终浓度±30%不影响使用。为了方便使用，用去离子水将10×菌落/菌液PCR增强剂稀释为1×，替代去离子水。

3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀，简短离心。

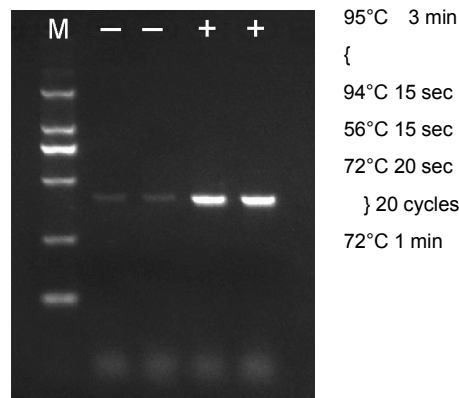
4. PCR反应循环设置举例

| | | |
|--------|---------|----------------|
| 95°C | 3 min | } 20-30 cycles |
| 94°C | 30 sec | |
| 55°C※ | 30 sec | |
| 72°C | 1 min § | |
| 72°C | 5 min | |
| 4-10°C | soak | |

※以实际最佳退火温度为准。§以1 kb/min计算。

● 实验示例

20 μl PCR体系中加入1 μl过夜培养的菌液，扩增400 bp片段。用如下循环参数进行PCR，取2 μl电泳。



M: DL2000

-: 未加10× 菌落/菌液PCR增强剂

+: 加10× 菌落/菌液PCR增强剂

● 菌落/菌液PCR注意事项

1. 选择合适的引物

连接产物转化后未插入载体的目的片段可能会造成假阳性，因此尽量不要使用目的片段上的特异性引物。

如果使用T/A连接，尽可能使用载体上的通用引物进行PCR（例如T7和SP6）。

如果使用双酶切后插入片段，可使用载体上的一条通用引物和目的片段上的一条引物进行PCR。

2. 使用尽可能少的菌液或者菌落

极少量的菌液或者菌落是可以作为有效的PCR模板，过多的菌液或者菌落可能会抑制PCR。

一般20 μl PCR体系使用菌液的体积不可超过1 μl。

3. 适当延长预变性时间

质粒DNA变性为单链后才能有效作为模板。使用质粒DNA作为模板，或者加入菌落/菌液PCR增强剂后进行菌落/菌液PCR，预变性时间不可少于3 min。

4. 使用适当的循环数

细菌基因组DNA会干扰PCR，循环数过多可能会出现非特异性扩增。

加入菌落/菌液PCR增强剂后，只需20-30个循环即可。

● 常见PCR污染的处理方法

1. PCR仪污染

PCR仪热盖效果差，或者PCR管密封性差，在PCR结束后会有PCR产物污染PCR仪。如果使用相同的引物再进行PCR可能会出现假阳性。

如果PCR仪被污染，将PCR仪在98-99°C运行30 min。在高温下残留的DNA断裂而不能作为有效模板。

2. 移液器污染

可高压灭菌的移液器，建议高压灭菌，在高温下残留的DNA断裂而不能作为有效模板。

或者将移液器插枪头的位置浸泡的稀盐酸中30 min (处理时间不可过长，不然会腐蚀移液器)，再用去离子水冲洗干净。强酸性条件下，残留的DNA发生脱嘌呤而不能作为有效模板。

3. PCR试剂污染

更换PCR试剂。

一般被某一种PCR产物污染的PCR试剂可用于其它PCR反应。

● PCR产品选择指南

| 实验目的 | 产品选择 |
|------------------------------------|--|
| 克隆普通长度(≤3 kb)的目的 DNA 片段 | Taq DNA polymerase |
| 保真度要求较高，片段比较短(≤1 kb)，如点突变、基因筛选等 | pfu DNA polymerase |
| 高保真长片段扩增(1-10 kb)，如构建基因图谱及分子遗传学研究等 | Taq Plus DNA polymerase |
| 模板 DNA 质量差，比如从石蜡切片中提取的基因组 DNA | 根据保真性和扩增长度选择 |
| 待扩增片段拷贝数低，比如逆转录效率低的 cDNA | 2× Taq PCR MasterMix |
| GC 含量较高或二级结构较复杂的模板 DNA | 2× Pfu PCR MasterMix |
| 样品数量大，进行大规模 PCR | 2× Taq Plus MasterMix |
| 使用兼并引物 | pfu DNA polymerase Taq Plus DNA polymerase 2× Pfu PCR MasterMix 2× Taq Plus MasterMix |
| 菌落/菌液 PCR | Taq DNA polymerase 2× Taq PCR MasterMix 10× 菌落/菌液 PCR 增强剂 |
| 多重 PCR | 2× Multiplex PCR MasterMix |