

酵母阳性克隆快速检测试剂盒 使用说明书

保存条件：-20 °C 储存，未开封有效期 24 个月。

包装内容：

产品内容	SK2420-50T	SK2420-200T
菌落裂解液 I	250 μ L	1 mL
PCR Mix	1.5 mL $\times$ 2	1.5 mL $\times$ 6
3AD & 5AD 引物混合物	50 μ L	200 μ L
菌液裂解液 II（免费提供）	25 μ L	100 μ L
说明书	1 份	

产品说明：

本产品用于酵母单杂双杂筛库系统，可以快速地扩增、分选并分析文库筛选所获得的阳性克隆中 prey/文库质粒的 cDNA 插入片段。

PCR Mix 含 Taq、dNTP、PCR buffer 和水，只需要补充模板 5 μ L，引物混合物 1 μ L 即可用于 PCR 扩增。可供 50 μ L PCR 体系进行 200 次扩增实验。3AD & 5AD 引物混合物可用于 pGADT7、pGADT7-Rec、pGADT7-Rec2 系列载体构建的 AD 文库。每 50 μ L 体系加入 1 μ L 引物混合物。亦可根据需要加入自备引物。本试剂盒除提供菌落裂解液 I 用于平板菌落 PCR 外（可供 200 T），还免费提供菌液裂解液 II 用于菌液 PCR（可供 20 T）。

使用方法：

菌落样品

1. 准备 PCR 预混液：根据检测克隆数，等比例扩大配制体积。

试剂	50 μ L 反应体系
PCR Mix	44 μ L
3AD & 5AD 引物混合物 (或其它上下游引物)	1 μ L (各 0.5 μ L)

2. 吸取 5 μ L 菌落裂解液 I 加入 PCR 管中（如处理样品量大，建议用 8 联排 PCR 管）。
3. 用无菌牙签或者枪头刮取适量直径 1-2 mm 的酵母菌落悬浮在菌落裂解液 I 中。
4. 吹打或者震荡混匀后，静置 5 min，即为裂解产物。
5. （可选步骤）于 -20 °C 冷冻 5 min 或置于 -80 °C 冰箱速冻 10 s。
6. 在裂解产物中加入 45 μ L PCR 预混液（已加引物），直接 PCR 扩增。

注意：

1. 先取 3-5 个克隆进行预实验后再进行批量实验。
2. 培养时间短的样品，无需冷冻。冷冻完的样品可直接加入 PCR 预混液，解冻与否均可。
3. 团状酵母菌落很难裂解，吹打或者震荡混匀尤为重要。

菌液样品

1. 吸取 5-10 μL 菌液裂解液 II 加入 PCR 管中（如处理样品量大，建议用 8 联排 PCR 管）。
2. 再加入等体积的酵母菌液，震荡混匀。
3. 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 3 min 或置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱速冻 10 s 后，PCR 仪 95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min。
4. 12,000 rpm 离心 2 min，取裂解产物（上清），用于 PCR 扩增。

PCR 反应体系：

试剂	50 μL 反应体系
PCR Mix	44 μL
3AD & 5AD 引物混合物 (或其它上下游引物)	1 μL (各 0.5 μL)
裂解产物	5 μL

PCR 反应条件：

反应温度	反应条件	循环
95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	30-35
55 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	+ ∞	1

注意事项：

1. 菌落 PCR 前，先刮取部分菌落保存，可以有效避免样品污染和丢失。
2. 新鲜菌落的 PCR 成功率接近 100%。如生长期较长的菌落，请先进行预实验。
3. 如部分样品经过多次 PCR 都无法检测成功。建议小摇之后，用快速酵母质粒提取试剂盒（PE052）提取（约需 30 min），再进行 PCR 扩增。

更多筛选培养基及相关产品详见 www.coolaber.com