

Yeast Direct PCR Kit 酵母直扩试剂盒

■ 目录号

TSE0302

■ 产品名称

本产品是一款专门为酵母直接扩增设计的试剂盒,适用于扩增 3 kb 以内 DNA 片段。酵母样品经过简单的裂解处理,即可作为 PCR 模板,无需进行核酸提取,使用更简便快捷。该产品由裂解液和 2×PCR 预混液组成,预混液中含 Mg^{2+} 、dNTPs、亲和体修饰的 Taq DNA 聚合酶以及精心优化的缓冲体系,因此具有更高的产量、更好的稳定性及更强的耐脏性,使用时只需要加入引物和模板并补水至 1× 浓度即可。该预混液含有 Loading Buffer,反应结束后可直接进行电泳检测。本产品扩增产物的 3' 端带 A,可直接用于 TA 克隆(推荐 T 载体目录号:TSV-007)。

■ 产品组成

组分	规格
2×Yeast Direct PCR Mix	5×1.0 mL
Yeast Lysis Buffer	2×10 mL

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品应用

适用于酵母样本(酵母重组质粒目的片段或基因组序列)的直接扩增。

■ 注意事项及准备

- 建议使用新鲜的样品,尽量避免使用长期储存或反复冻融的样品;
- 样品经热裂解处理后,振荡可以促进 DNA 释放,静置或者离心后取上清液扩增即可;
- 为保证实验效果,建议每次扩增均使用新鲜裂解产物为模板;
- PCR Mix 应避免反复冻融,短期内多次使用可置于 2~8°C 保存;
- 为便于使用,Yeast Lysis Buffer 可在 2~8°C 保存,保质期 2 年。

■ 操作步骤(实验前请先阅读注意事项)

1. 模板制备

1) 酵母单菌落:吸取 10 μ L Yeast Lysis Buffer 到 PCR 管中,使用 10 μ L 枪头挑取酵母单菌落到上述裂解液里,吸打混匀后,置于 PCR 仪中 98°C 加热 5 min。裂解完成后,瞬时离心 10 s 左右,取 1 μ L 上清液作为扩增模板。

2) 酵母菌液:按照菌液与裂解液体积比 5:1 (v/v) 进行裂解,例:取 150 μ L 酵母菌液到 PCR 管中,离心 30 s 左右,弃上清,加入 30 μ L Yeast Lysis Buffer,置于 PCR 仪中 98°C 加热 5 min。裂解完成后,瞬时离心 10 s 左右,取 1 μ L 上清液作为扩增模板。

2. 推荐 PCR 反应体系

组分	25 μ L 体系	50 μ L 体系
2×Yeast Direct PCR Mix	12.5 μ L	25 μ L
10 μ M 上游引物 ^a	1 μ L	2 μ L
10 μ M 下游引物 ^a	1 μ L	2 μ L
裂解产物 ^b	1 μ L	2 μ L
ddH ₂ O	Up to 25 μ L	Up to 50 μ L

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

a. 引物终浓度范围为 0.2~0.8 μ M,推荐使用 0.4 μ M,过少的引物会导致扩增失败或产量低,过量的引物可能导致非特异性扩增,可根据实际情况适当调整用量。

b. 过量的模板会导致非特异性扩增或者抑制扩增,过少的模板易导致扩增效率低,推荐模板使用量为 1~2 μ L。

3. 推荐 PCR 反应程序

步骤	反应温度 (°C)	反应时间	循环数
预变性	94	3 min	1
变性	94	30 s	30~35 ^c
退火	T _m	30 s	
延伸	72	30 s/kb	1
终延伸	72	7 min	
保存	4~12	∞	

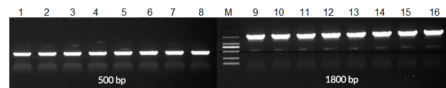
c. 扩增循环数:正常情况下,30 个循环可扩增足量产物,若产量偏低,可增加循环数至 35。

4. 扩增产物鉴定

扩增产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳,无需添加 Loading Buffer。

5. 案例

毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中重组质粒目的基因片段的扩增胶图:



03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 常见问题与解决方案

常见问题	可能原因	解决方法
扩增失败	模板量过多	可进行模板量梯度实验, 选择最适模板量
	样品不新鲜	建议使用新鲜的酵母菌, 避免使用长期储存样品
	试剂保存不当	使用新的试剂盒, PCR Mix长期保存应在-25~-15℃, 避免反复冻融
	引物质量差	使用纯化后的基因组模板验证引物质量, 若仍然无法扩增可重新设计合成引物
	退火温度不合适	做退火温度梯度PCR (推荐以2℃为梯度), 摸索最佳反应条件
非特异性扩增	产物量过低	增加延伸时间、循环数或模板量
	退火温度过低	提高退火温度或尝试Touchdown PCR程序
	延伸时间过长	缩短延伸时间 (非特异条带大于目的片段时适用)
	循环数过高	减少循环数
	模板用量过高	减少模板用量或将模板稀释后扩增
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	引物特异性差	适当延长引物或重新设计引物
产物呈现高/低分子量弥散条带	退火温度不合适	以梯度PCR (推荐以2℃为梯度) 摸索最佳退火温度
	模板用量不合适	可在正式实验前先进行模板梯度扩增, 选择最合适的模板用量, 一般不超过体系的1/10
	循环数过高	减少循环数
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	延伸时间过长	适当缩短延伸时间 (高分子量弥散条带适用)
	体系杂质含量高	电泳前离心取上清 (低分子量弥散条带适用)
阴性对照扩增出目的条带	污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液 (目录号: TSP001) 对操作环境及空气进行清洁处理
		使用无菌耗材, 及时更换枪头

■ 保存条件

-25~-15℃保存, 保质期2年。干冰运输。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

■ 关联产品推荐

系列	产品名称	货号	规格
提取系列	Trelief® Plasmid Mini Kit Plus 高纯度质粒小提试剂盒	TSP502-200	200 次
PCR系列	2×T5 Super PCR Mix (Colony)	TSE005	5×1 mL
	GoldenStar® T6 Super PCR Mix Ver.2 (1.1×) 金牌Mix Ver.2	TSE102	5×1.125 mL
	2×T8 High-Fidelity Master Mix	TSE111	5×1 mL
克隆系列	pClone007 Versatile Simple Vector Kit	TSV-007VS	60 次
	Trelief® Seamless Cloning Kit	TSV-S3	20 次
感受态系列	Trelief® 5α Chemically Competent Cell	TSC-C01	10×100 μL
	Y1HGold Chemically Competent Cell Y1HGold感受态细胞	TSC0501	10×100 μL
	Y2HGold Chemically Competent Cell Y2HGold感受态细胞	TSC0502	10×100 μL
	AH109 Chemically Competent Cell AH109感受态细胞	TSC0503	10×100 μL
	Y187 Chemically Competent Cell Y187感受态细胞	TSC0504	10×100 μL

