



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 通用T载体菌落PCR鉴定试剂盒
- ◆ 目录号 **CV05**
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

通用 T 载体菌落 PCR 鉴定试剂盒

目录号: **CV05**

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

组成	80 次 (CV0501)	-100 次 400 次 (CV0502)	-500 次
2 × Taq PCR MasterMix	1ml		5ml
Universal primer F	50μl		250μl
Universal primer R	50μl		250μl
ddH ₂ O	1ml		5ml

储存: -20 °C 保存。

❖ 产品介绍:

菌落PCR鉴定是T载体克隆连接后鉴定是否有阳性克隆(含插入片段)最方便快捷的方法。但是市面上能见到的菌落PCR鉴定试剂盒采用的都是T3,T7或者SP6等特异T载体引物,只能用于某种特定T载体连接阳性克隆的鉴定。如果使用不同T载体,便需同时购买多种鉴定试剂盒,大大增加了使用成本。本公司采用通用T载体引物研制的通用T载体菌落PCR鉴定试剂盒,只需购买一种试剂盒,便可用于市面上所有常见的T载体(包括pGEM, pUC, pBluescript系列)连接阳性克隆的鉴定。此外,采用T3,T7或者SP6做引物的菌落PCR鉴定试剂盒引物距离插入位点的距离非常短,因此在鉴定100bp左右或者更小片段的插入时,阴性克隆的引物二聚体条带和阳性克隆扩增条带大小接近,无法区分。往往把引物二聚体的条带看成是阳性扩增条带,造成假阳性。反之,造成假阴性。本试剂盒通用T载体引物在未插入片段时的距离至少有150bp以上,加上插入片段的长度,可以清晰的区分是插入片段扩增出的条带还是引物二聚体扩增出的条带。避免假阳性或者假阴性,大大提高了准确性。本公司研发的一管便携式PCR MasterMix预混系统,无需您一一加入各种成分,直接加入需筛选单菌落,经过1小时左右的PCR反应和电泳检测即可得到重组菌落鉴定的结果。



❖ **预期扩增片段：**

T 载体名称	载体来源	未插入片段时 通用 T 载体引物间距离	预期扩增片段长度 (以插入 300bp 片段举例)
pGEM-T Easy	pGEM	281bp	581bp
pGEMX-T Easy	pGEM	289bp	589bp
pMD18-T	pUC18	158bp	458bp
pMD19-T	pUC19	158bp	458bp
pSURE-T	pUC19	239bp	539bp
pUCm-T	pUC19	239bp	539bp
pBLUE-T	pBluescript	300bp	600bp

❖ **注意事项：**

1. 重组菌落鉴定时，挑取单菌落前，应先做好标记，便于鉴定后使用。
2. 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。
3. 设定 PCR 程序时，请根据插入片段大小决定延伸时间，如果插入片段大小为 1 kb 以下，延伸时间 30-45 秒即可，如果片段更长，可按此比例增加延伸时间。

❖ **操作步骤（以 25 μ l 体系举例，客户也可以采用 20 μ l 体系）：**

1. 按以下体系配好含有引物的 1 x Taq MasterMix 反应液。

2 × Taq PCR MasterMix	12.5 μ l
Universal primer F (10 μ M)	0.5 μ l
Universal primer R (10 μ M)	0.5 μ l
ddH ₂ O	11.5 μ l

2. 将过夜培养的平板上的菌落编号后，使用灭菌的枪头挑取一部分单菌落加入上述反应液，吹打混匀使菌落充分分散到反应液中。
可多设置一管不加菌落的阴性对照，以便于分析实验结果。
3. 将 PCR 管置于热循环仪上按以下条件开始反应，推荐条件如下：



94°C 5 min
94°C 30 sec
55°C 30 sec
72°C 0.5-1 min
72°C 5 min

} 30-33 cycles

注意：延伸时间请根据插入片段大小调整。

4. 反应结束后，取 5-10 μ l 直接上样电泳检测。