

天
净
沙
系
列

CAT#:70803-500
低温运输及保存

TIANDZ

天净沙单菌落筛选液

Tiandz Colony Screening Solution

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

本产品能够快速裂解单个 *E.coli* 菌落或单个菌落培养 2 小时后得到的细菌，裂解液跟各种后续反应兼容，可以直接用于多种后续转座子筛选实验。本产品具有下列特点：

1. 不需要过夜培养细菌，直接用单菌落提质粒（对低拷贝质粒的转化子，需要培养 1 小时后提质粒）。
2. 提取质粒操作简单快速，只需要不到 2 分钟，只需要单溶液。
3. 裂解液可以直接电泳判断质粒是否有插入片段，包括电泳在内的整个过程约需要一小时。比常规的过夜培养、质粒制备、酶切电泳快一天时间。
4. 裂解液也可以直接用于酶切筛选转化子，包括电泳在内的整个过程约需要 90 分钟。
5. 裂解液也可以直接用于 PCR 筛选转化子，包括电泳在内的整个过程约需要三小时。
6. 本规格足够 500 次筛选。

规格及成分

成分	编号	塑料袋包装
天净沙菌落筛选液	70803	1.5 mL × 10
使用手册	70803sc	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

转化子、LB 液体培养基、内切酶、电泳相关试剂

使用方法

一、转化宿主菌

1. 对高拷贝质粒转化子，直接将转化后得到的单个新鲜菌落 (2-5 mm 直径) 转移到装有 30 μ L 天净沙菌落筛选液的塑料离心管中（使用 0.2 mL 的 PCR 薄壁管），轻柔吹打混匀得细菌重悬液。同时对离心管和培养皿背面菌落所在位置做标记，以便筛选到转座子后可以回来挑选菌落进行培养。
2. 对低拷贝质粒转化子，建议将单个新鲜菌落接种到 0.2 mL 含相关抗菌素的 LB 液体培养基中（使用 0.2 mL PCR 薄壁管）。同时对离心管和培养皿背面菌落所在位置做标记，以便筛选到转座子后可以回来挑选菌落进行培养。然后将离心管放在 PCR 仪器中 37℃保温 2 小时，保温结束后离心 10000 rpm 1 分钟（PCR 管可放入一个 1.5 mL 离心管中离心），小心移弃上清，加入 30 μ L 的本产品轻柔吹打混匀得细菌重悬液。
3. 如果不知道质粒是高拷贝还是低拷贝，分别取一个菌落按步骤 1 进行，另一个菌落按步骤 2 进行。

二、制备细菌裂解液

4. 在 PCR 仪器上设置程序，100℃ 1 分钟，4℃无限长并开启热盖。将细菌重悬液上机按程序进行处理。进入 4℃后即可取出样品进入下一步。
5. 10000 rpm 1 分钟（PCR 管需要放入一个 1.5 mL 离心管中离心），小心将上清液转移到一个新的离心管中待用，此上清液即为转化子裂解液。
6. 所得转化子裂解液可以按下列三种方法之一筛选转化子，也可以用这三种方法的任意组合来筛选转化子。

三、不酶切直接电泳检测

7. 取 15 μL 转化子裂解液、空载体和 DNA marker 上样进行琼脂糖电泳，由于环状质粒电泳时泳动速度跟质粒大小不完全对应，因为它还跟质粒构型相关，所以最好用不含插入片段的环状空载体做对照，含有插入片段的质粒电泳速度将快于空载体。天净沙菌落筛选液中含有电泳示踪剂（电泳速度相当于 50 bp DNA 片段），故可以直接上样，不需另加电泳上样液。

四、内切酶酶切后电泳检测

8. 将 15 μL 转化子裂解液与 1 μL 限制性内切酶混合，如果是双酶切，则两酶各加入 1 μL。尽量设置空载体酶切对照。本试剂跟常用的限制性内切酶兼容(详见清单)，使用名单之外的内切酶需做预实验。

可选限制性内切酶清单：

AatII	EcoRI	NarI	SacI	SphI
ApaI	EcoRV	NcoI	SacII	StuI
BamHI	HindIII	NdeI	SalI	XbaI
ClaI	HpaI	NheI	ScaI	XcmI
DraI	KpnI	PstI	SmaI	XhoI
EagI	NaeI	PvuII	SpeI	XmaI

9. 在内切酶的最适反应温度保温 10-20 分钟。对转化子筛选，不充分酶切结果是可以的。
10. 取全部酶切样品、空载体酶切样品（如果有的话）和 DNA marker 直接上样进行琼脂糖电泳并分析实验结果。本试剂含有电泳示踪剂（电泳速度相当于 50 bp DNA 片段），故可以直接上样。注意：判断是否有插入片段并不需要彻底酶切，比如含某插入片段的质粒完全酶切可以得到 3 kb（载体）和 1.5 kb（插入片段）两条带，则 10 分钟不完全酶切会得到 4.5 kb、3 kb 和 1.5 kb 三条带，此三条带足够证明质粒含插入片段，因为不完全酶切空载体只能得到 3 kb 一条带。

五、PCR 鉴定

11. 取转化子裂解液原液 1 μL，用水稀释 10 倍和 100 倍，然后各取 1 μL 作

	<p>为 PCR 的模板进行 PCR。用户需要提前根据载体或插入片段序列设计相应的引物。本手册不提供相关操作流程和试剂。</p> <p>六、后续处理</p> <p>12. 如果某转化子含有所需质粒，可以在培养皿上按标记找到菌落残余，并接种到含相关抗菌素的 LB 液体培养基中进行培养，然后用于保种、质粒制备、DNA 测序等实验。</p>
关联产品	免感受态细胞转化液 (CAT#: 51101)