

## 菌落 PCR

菌落 PCR 与我们通常的普通 DNA 的 PCR 的不同在于，**直接以单个菌作为模板**。是一种可以快速鉴定菌落是否为含目的质粒的阳性菌落。操作简单，快捷，阳性率较高，在转化鉴定中较常见。

### 操作方法：

- 1, 挑取单个菌落，可以用高压灭菌的牙签。现在含抗性的平板上画线，做保种用，然后置于 20ul Triton - x100 中搅和一下，将相应的菌和板子上的画线区做上对应的记号
- 2, 将装有 20ul Tritonx - 100 的 EP 管 100 度煮 2 分钟
- 3, 按照菌中预期包含的质粒加好 PCR 体系，建议做 20ul 体系，模板加煮过的菌的上清 1ul
- 4, 上机即可。退火温度可以稍低，虽然没有什么根据可言，但是个人经验，推荐比质粒 PCR 时**稍低**
- 5, 电泳，看结果，阳性的菌落对应的板子可以直接挑菌小摇，保种或者送测序都可以

### 方法细节：

用枪头挑选单菌落到装有 20uL 水的 pcr 管中，然后悬浮菌液。

在做 PCR 时，吸取 1uL 做模板，但电泳检测后，**选有阳性克隆相对的菌液 10uL 与试管的液体培养基中培养**。这样做，既初步检测了阳性克隆，又保存了所需要的菌落。

当然，在挑菌时也有用接种环挑的，有用牙签挑的，看个人的爱好了

我们都是直接拿牙签挑单菌落往 PCR 反应体系中搅拌一下，一般都能鉴定出来。想节省麻烦的话，还可以菌落鉴定同时挑单克隆，用 1.5 的 EP 管装 1mL 左右培养基，牙签挑出菌落后先在培养基上搅拌然后再放到 PCR 反应体系中。

把 PCR 体系先加好,用接种针直接往菌落上戳一下然后伸到体系里面晃晃就可以上机 P 了,我每次都是这样,可能是最方便的方法了。

取 200ul 水,牙签挑菌,煮沸 5',冰浴 5',12000rpm,取上清 5ul 做模版。其他的和普通 pcr 一样。

我们都是用过夜培养的菌液 0.3ul (不要超过 0.5ul) 做模板,很简单的,其它都不变。先 94 度 5min 裂解菌,最好 5min 后再加入 taq 酶。

是的,菌落 PCR 不难。。但是如果发现结果出现非特异带,在目的带位置有很弱的条带出现,最好再用液体培养后再做一次 PCR,我就因为这个阴性结果折腾了 1 个月。。扩培后再作菌落 PCR 就得到阳性结果了。。

我是这样做的,取菌液 60ul 至 ep 管中,沸水中煮 5min,离心,取其中上清 1ul 作模板,屡试不爽

拿牙签点一下菌落然后再体系里面涮一下就可以了

如果觉得不可靠,就索性接个种,摇个小管,然后取 1ul 作模板

模板如果太多了,引物就不够用了,显然扩不出来,这种现象在质粒这种模板的 PCR 里面很多,你提出来的质粒不要忘记稀释

一般来说, 菌落 PCR 能够筛选阳性克隆. 象你的实验中出现的这种假阳性结果, 也不是什么太反常的事情, 细菌本身的基因组也是反应系统中的组分, 所以难免有些假阳性的结果. 建议多用几对不同的引物扩增, 以增加真阳性筛选结果.

一般会出现假阳性, 可能是粘在菌落上的目的基因被污染, 建议引物一个为目的基因一个为载体上的, 用无菌牙签挑取菌落, 在配好的 PCR 体系中煮一下, PCR 反应条件为 95 度 10 分钟 94 度 40 秒退火 55 度 40 秒 72 度 1 分钟 30 个循环

建议酶切后鉴定时同时取一个未做酶切的质粒做对照, 明确是否能切断, 再考虑是否能切出目的片段。

假阳性并不高, 可挑菌落摇菌 12 小时以上再取菌液 pcr, 初始变性温度可设为 98 度。

我们一般将接种好的菌液煮沸 15min, 4000rpm 离心 5min, 用上清作模板, 效果很好。

非常方便的方法, 我做了不知多少次, 从未失手.

1. 挑取菌落加入 50ul dd 水中, 振摇.

2. 99 度, 5' 灭活菌液中的酶

3. 12000rpm 离心 1' 去除细胞碎片

4. 取上清 pcr, 50ul 体系取 10ul

我做就是将菌株挑一点点加入 PCR 体系中, 涮一涮. 我没有煮沸和离心. 剩下的菌落放到 37 度继续让它长大一些, 方便接种.

刚做的时候强烈建议大家要做阴性对照和阳性对照, 因为有时候会有假阳性, 即使阴性对照也

会在目的位置出现条带,只是亮度弱一些而已.

我的经验是:若是真阳性,会很亮,让你不会怀疑;如果似有似无,一般都是假阳性.

菌落 PCR , 菌液 PCR (菌液的体积不能过大,大了会影响 PCR 体系,导致扩增不出来,一般取 0.3 微升左右就行了) 都可以的,一般 10 微升的 PCR 体系,跑样时用小梳孔,(凝胶使用第一次时做回收用,将溴酚兰及核酸以外的凝胶割下来,就可以再用来做鉴定胶了,一般鉴定用的旧胶用 2 次都是可以的,比较节省)。

理论上,基因特异性引物和载体上的通用引物都是可以的。最重要的是带 marker,先判断大小。当然最后还要提质粒酶切鉴定一下。一般 PCR 阳性的菌,正确的可能性非常大。但也不排除 PCR 阳性,但酶切阴性的可能,因为如果基因是 PCR 后克隆到载体的,可能会存在碱基突变的可能。

所以需要 PCR 和酶切两种方法鉴定。但最终应以测序的结果为准。

跑得很好的电泳: 200v, 我的目的片断是 400 多 pb, 2%普通胶, 跑了大概 20 分钟左右吧

菌落 PCR 很容易出现假阳性, 可能与菌落本身的含量过于复杂所导致的

1. 用载体引物来作一般可以降低假阳性。
2. 菌落 PCR 作出来如果都是阳性或是阴性都不对, 如果出现有的有, 有的没有, 那么可以将其摇成菌液, 作菌液 PCR, 或是直接再次涂版, 然后提取菌落作 PCR, 如果个个都是, 证明准确。

3. 菌落 PCR 的假阳性很引物本身有很大的关系，所以建议鉴定做好还是酶切最为可靠，我吃过很多关于菌落 PCR 的亏，所以建议还是酶切

试一下热启动，可以消除引物二聚体。