

Takara Code : D304

Lysis Buffer for Microorganism
to Direct PCR
(100 次量)

说明书

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
• 制品说明	1
• 制品内容	1
• 保存温度	1
• 注意事项	1
• 操作方法	1
• 实验例	2
• Q&A	5
• 使用本试剂能够有效裂解的菌种一览表	6

● 制品说明

本制品是一种能够快速裂解大部分细菌、真菌等微生物，使其释放核酸，然后直接用于各种PCR检测反应的试剂。各种细菌、真菌等微生物已经成为现阶段分子生物学研究领域的重要材料，但对于这些微生物的鉴定和筛选比较耗时费力，传统的方法需要提取基因组DNA，然后再进行PCR检测，这种方法得到的结果较为准确，但操作复杂，需要的菌体量大，且容易造成样品间的相互污染。也有一些使用热变性的方法对大肠杆菌等细菌直接进行检测的方法，但其应用范围较小，对于大部分真菌以及细胞壁较厚的革兰氏阳性细菌并不适用。

本制品可以对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母菌、霉菌等大部分微生物进行裂解，释放其基因组DNA，所得的裂解液可直接用于PCR反应，省去了提取基因组DNA的操作，节省时间，减少了样品之间的污染，能够达到微生物快速PCR检测的目的。

● 制品内容 (100 次量)

Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR

1 ml×5 支

● 保 存： 室温

● 注意事项

1. 操作注意

- ① 本试剂具有一定的腐蚀性，使用时应戴手套、眼镜，避免液体溅到身体上，如不慎溅到皮肤上，应立即用大量清水冲洗。
 - ② 菌体的取量会影响实验结果。平板上的菌落用牙签或灭菌枪头挑取即可，液体培养的菌丝应取一毫米左右。
 - ③ 裂解后，作为 PCR 反应的模板加量不应超出 PCR 反应体系的 1/10 (V/V)。
2. 本试剂在温度较低时，溶液中可能会出现分层或絮状沉淀，使用前请于 37°C 水浴中加热并混匀。
 3. 本制品为悬浊液，使用前应充分混匀。
 4. 本试剂保存一段时间后颜色会变浅，此为正常现象，不影响实验结果。
 5. 本试剂适用的微生物种属请见附表。不在其中的微生物，本试剂不承诺可以有效裂解。
 6. 裂解上清液适用于 *TaKaRa Ex Taq*[®]、*TaKaRa LA Taq*[®] 以及 *Premix Ex Taq*[®] Version 2.0 的反应体系，其他 PCR 反应体系未进行评价，不承诺一定能够进行有效扩增。

● 操作方法

1. 菌体裂解。

- ① 取 50 μ l Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 于灭菌的 Microtube 中。
- ② 用灭菌牙签或枪头挑取单菌落，置于 Microtube 中搅动几下后取出。
注：牙签置于 Microtube 中的时间不要过长，否则会影响裂解液的体积，并会影响 PCR 扩增效果。
- ③ 80°C 热变性 15 分钟后，低速离心，取 1~5 μ l 裂解后的上清液作为 PCR 反应的模板。

2. PCR 反应体系。

试剂名称	使用量
裂解上清液	1~5 μ l
<i>Premix Ex Taq</i> [®] Version 2.0	25 μ l
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

注：阴性对照取 1~5 μ l 的 dH₂O 替代裂解上清液。

3. PCR 反应条件。

94°C	10 min	} 30 Cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	X min*	
72°C	5 min	

* 延伸时间因目的片段长度的不同而不同，使用 *TaKaRa Ex Taq*[®] 时，延伸时间按 1 kbp/min 进行设定。

4. 琼脂糖凝胶电泳确认。

使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，确认 PCR 扩增产物的大小。

● 实验例

【实验例 1：以毕赤酵母细胞裂解液为模板进行 PCR 扩增】

毕赤酵母细胞壁较厚，使用常规方法热变性后进行 PCR 检测常常存在假阴性的现象，因此，通常要先提取酵母菌基因组 DNA 后再进行 PCR 反应，以筛选阳性克隆或进行目的基因扩增。这种方法对于筛选大量重组体是非常艰难的。使用本试剂可以直接以毕赤酵母细胞裂解液为模板进行 PCR 扩增，可以对大量重组体进行快速筛选。

1. PCR 反应模板的获取。

将含有目的基因 (1.8 kbp) 的 pPIC9K 质粒转化至毕赤酵母 (GS115) 感受态细胞中，涂布 MD 平板，30°C 培养 48 小时。长出单菌落后，用牙签从单菌落上挑取少量的菌体至含有 50 μ l Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 的 Microtube 中搅动数下后取出，菌液于 80°C 热变性 15 分钟后低速离心，取 5 μ l 裂解上清液作为 PCR 反应的模板。

2. 按下列组份配制 PCR 反应液。

试剂名称	使用量
裂解上清液	5 μ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	5 μ l
dNTP (各 2.5 mM)	8 μ l
3'AOX Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
5'AOX Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

注：阴性对照取 5 μ l 的 dH₂O 替代裂解上清液。

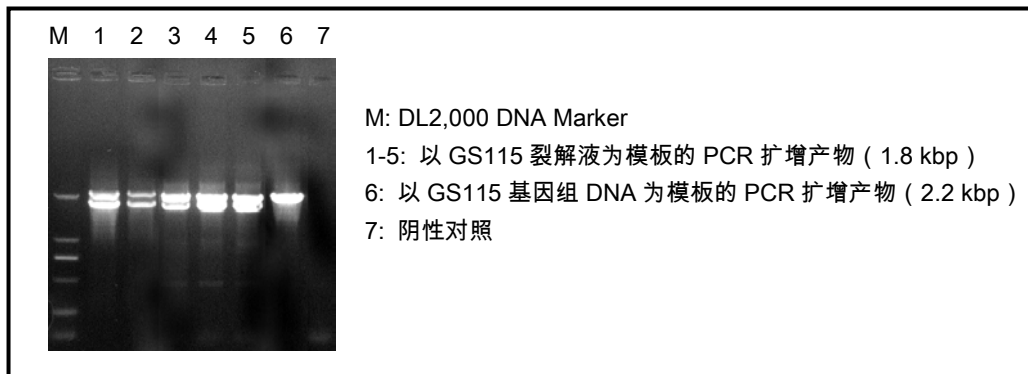
阳性对照取 1 μ l 的 GS115 基因组 DNA 作为模板。

3. PCR 反应条件。

94°C	10 min	} 30 Cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	5 min	

4. 琼脂糖凝胶电泳。

使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，电泳结果见下图。



【实验例 2：以真菌裂解液为模板进行 PCR 扩增，以鉴定真菌种类】

使用本试剂对真菌进行裂解，结合 Takara 公司的真菌鉴定试剂盒 Fungi Identification Kit (Takara Code : D317)，对真菌种类进行鉴定。

1. PCR 反应模板的获取。

用灭菌牙签分别挑取少许五种真菌 (*Hypocrea jecorina*, *Aspergillus fumigatus*, *Mortierella isabellina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*) 的单菌落，置于含有 50 μ l Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 的 Microtube 中搅动数下后取出，菌液于 80°C 热变性 15 分钟后低速离心，取 5 μ l 上清液作为 PCR 反应的模板。

2. 按下列组份配制 PCR 反应液。

试剂名称	使用量
裂解上清液	5 μ l
<i>Premix Ex Taq</i> [®] Version 2.0	25 μ l
Forward Primer* (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse Primer* (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

* 引物及扩增片段信息如下：

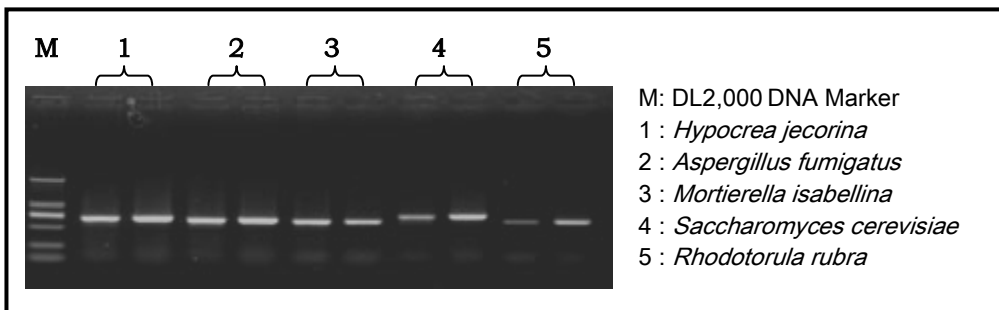
Sample No.	样品名称	引物名称	目的片段大小
1	<i>Hypocrea jecorina</i>	D1/D2 Forward Primer/ D1/D2 Reverse Primer	600 bp
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>		600 bp
3	<i>Mortierella isabellina</i>		600 bp
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ITS Forward Primer/ ITS Reverse Primer	750 bp
5	<i>Rhodotorula rubra</i>	D1/D2 Forward Primer/ D1/D2 Reverse Primer	600 bp

3. PCR 反应条件。

94°C	10 min	} 30 Cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

4. 琼脂糖凝胶电泳。

使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，电泳结果见下图。



● Q&A

Q-1 PCR 扩增没有产物，原因有哪些？

- A-1
- ① 挑取的菌量过多。当菌体成份较为复杂时，挑取的菌量过多会抑制 PCR 反应。使用牙签或枪头挑取菌落时建议蘸到即可，不可挑取太多。
 - ② 挑取的菌量过少。菌量过少，模板 DNA 量少，PCR 就会检测不到。关于菌量的挑取请参见“注意事项”部分。
 - ③ 使用的菌落或菌丝不够新鲜。菌体存放时间过长，使用本试剂将难以裂解，最好选取新鲜培养的菌体。
 - ④ PCR 反应时，加入裂解液的体积过大，超出 PCR 反应体系的 1/10，建议加入裂解液的体积为反应体系的 1/10 以下。

Q-2 可以使用微量移液器反复吹打替代本试剂进行裂解吗？

A-2 不可以。酵母等细胞壁较厚，用微量移液器反复吹打起不到破碎作用，PCR 检测假阴性的可能性较大。

Q-3 用于 PCR 反应的裂解液的加量多少为宜？

A-3 实验验证，裂解上清液占 PCR 反应体系的 1/20 ~ 1/10 都可以有效地扩增出目的条带。但如果上清液的体积超过 PCR 反应体系的 1/10，会影响 PCR 扩增效果。

Q-4 延长裂解时间、提高裂解温度对实验会有影响吗？

A-4 本说明书中提供的裂解时间和裂解温度都是经过实验验证的最佳条件，我们建议不要更改裂解时间和裂解温度。

Q-5 本试剂是否对所有微生物都能有效裂解？

A-5 本试剂是一种广谱的微生物裂解液，可以裂解大多数的微生物菌体直接进行 PCR 检测。对于大多数革兰氏阴性菌，本试剂具有良好的裂解效果；对于大部分革兰氏阳性菌以及真菌等细胞壁较厚、成份较复杂的菌体也能裂解。但对于极少部分微生物（如放线菌），本试剂不能有效裂解。本试剂能够裂解的微生物的菌种名称见附表，不在其中的菌种本试剂不承诺能够有效裂解。

Q-6 经本试剂裂解得到的 DNA 可否用于电泳检测或限制酶切等反应？

A-6 经本试剂裂解得到的 DNA 含量极少，只能够用于 PCR 扩增反应，不适用于电泳检测或限制酶切等反应，利用琼脂糖凝胶电泳检测不到基因组 DNA。

Q-7 经本试剂裂解得到的上清液是否适用于所有 PCR 反应体系？

A-7 经验证，裂解上清液适用于 *TaKaRa Ex Taq*[®]、*TaKaRa LA Taq*[®]以及 *Premix Ex Taq*[®] Version 2.0 的反应体系，其他 PCR 反应体系未进行评价，不承诺一定能够进行有效扩增。

● 附表：使用本试剂能够有效裂解的菌种一览表

1. 使用本试剂对细菌进行裂解，结合 Takara 公司的 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Takara Code : D310)，成功地对细菌菌种进行了鉴定的主要细菌菌种见下表。

拉丁学名	主要菌种	拉丁学名	主要菌种
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	<i>Laribacter</i>	<i>Laribacter hongkongensis</i>
<i>Arthrobacter</i>		<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Mycobacterium</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
<i>Bordetella</i>		<i>Neisseria</i>	
<i>Bosea</i>		<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
<i>Burkholderia</i>		<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>
<i>Cellulomonas</i>		<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Rheinheimera pacifica</i>
<i>Dyella</i>	<i>Dyella ginsengisoli</i>	<i>Roseomonas</i>	
<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>	<i>Shewanella</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Exiguobacterium</i>		<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces mirabilis</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Sulfitobacter</i>	<i>Sulfitobacter delicatus</i>
<i>Gordonia</i>		<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>
<i>Gracilibacillus</i>		<i>Thermobifida</i>	
<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas salina</i>	<i>Variovorax</i>	<i>Variovorax paradoxus</i>
<i>Helicobacter</i>		<i>Veillonella</i>	
<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas vasicola</i>

2. 使用本试剂对真菌进行裂解,结合 Takara 公司的 Fungi Identification PCR Kit(Takara Code :D317),成功地 对真菌进行了鉴定的主要真菌见下表。

主要菌类	拉丁学名	主要菌类	拉丁学名
霉菌	<i>Hypocrea jecorina</i>	酵母菌	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
	<i>Aspergillus</i>		<i>Candida</i>
	<i>Claviceps purpurea</i>		<i>Cryptococcus laurentii</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Pichia guilliermondii</i>
	<i>Absidia coerulea</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Penicillium oxalicum</i>		<i>Rhodotorula rubr</i>
	<i>Mucor circinelloides</i>		
	<i>Phoma herbarum</i>		

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co.,Ltd..

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685 , 87641686
8008909508 , 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话：0411-87641681 87641683

传 真：0411-87619946 87621675

E.mail：service@takara.com.cn

网 址：http://www.takara.com.cn