

酵母菌菌落 PCR 实验设计

人大附中翠微学校 高二五班 陈梓睿 杨未晞

一、原料菌株：酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

二、实验材料

(1) 模板制作:

- ① 菌落培养 (酿酒酵母、无菌水、烧瓶、LB 培养基、涂布器、无水乙醇、酒精灯)
- ② 模板配置 (枪头、ddH₂O、EP 管)

(2) PCR

- ① 体系溶液 (引物、模板、2 × Taq mix、ddH₂O)
- ② PCR 装置 (10 μ L 加样枪、枪头、EP 管、离心机、PCR 仪、冰盒)

(3) 电泳成像

- ① 凝胶装置 (琼脂糖、1×TAE buffer、250mL 锥形瓶、微波炉、凝胶槽、制胶板、凝胶梳)
- ② 电泳试剂 (红色荧光染料、DL2000、1×TAE buffer)
- ③ 电泳装置 (稳压电源、电泳槽)
- ④ 成像装置 (成像仪)

三、实验参数

(1) 扩增序列数据

- ① 扩增区域: *Saccharomyces cerevisiae* 26S D1/D2
- ② 扩增序列 (615bp、47.48%-GC)
 - 1) 上游: 5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG……
 - 2) 下游: ……CCG TCT TGA AAC ACG GAC C -3'
- ③ 引物序列
 - 1) 上游引物: 5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3'
1:24
 - 2) 下游引物: 5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3' 615:597

(2) PCR 设置

- ① 试剂容量: 50 μ L
- ② 预变性: 95 $^{\circ}$ C 5min
- ③ 变性: 95 $^{\circ}$ C 2min 40s 30s
- ④ 复性: 54 $^{\circ}$ C 50s
- ⑤ 延伸: 72 $^{\circ}$ C 1min
- ⑥ 重复: ③-30s ④ ⑤ 28次
- ⑦ 再延伸: 72 $^{\circ}$ C 5min

(3) 电泳设置

- ① 泳道设置: DL2000、阴性对照、1 μ L、1.5 μ L、2 μ L、DL2000
- ② 电压设置: 120V

四、实验步骤

(1) 模板制作

- ① 实验开始前 72h 将酵母粉按 1:50 的比例加入无菌水搅拌配置酵母溶液，每隔 6h 搅拌一次溶液确保混匀。
- ② 实验开始前 48h 在超净工作台中用稀释涂布平板法接种酵母溶液至 LB 培养基，放入恒温箱中 28℃ 培养 48h。
- ③ 实验开始时在 EP 管中加入 10 μ L ddH₂O，在超净工作台中用枪头挑取培养基上的两个单菌落插入 EP 管，取菌液做模板。

(2) PCR

- ① 50 μ L 体系组别设置:

组别	-	1 μ L	3 μ L	5 μ L
上游引物	2 μ L			
下游引物	2 μ L			
模板	0 μ L	1 μ L	3 μ L	5 μ L
Taq mix	25 μ L			
ddH ₂ O	21 μ L	20 μ L	18 μ L	16 μ L

- ② 将试剂解冻后放入冰盒中，在 EP 管中按表格次序沿管壁不同位置分别加入试剂。将四组标记为 -、1、3、5 后放入离心机中以 4000rpm 瞬时离心使试剂充分混匀。
- ③ 将离心后的 EP 管均匀居中放入 PCR 仪，设置参数并启动 PCR 仪，等待 PCR 完成。

(3) 电泳成像

- ① 在 250mL 锥形瓶中加入 3g 琼脂糖和 150mL TAE buffer 制成 2% 琼脂糖凝胶，在微波炉中以最大火力加热 30 秒后取出锥形瓶振荡，重复这一过程直至琼脂糖完全溶解。将溶液水浴冷却至 50℃ 后加入 50mg 红色荧光染料（溴化乙锭），振荡。

- ② 冷却同时准备凝胶模具，将琼脂糖凝胶倒入模具，在室温下凝固后垂直方向取下凝胶梳。
- ③ 将凝胶置于电泳槽中，加入 TAE buffer 至覆盖凝胶表面 1mm 以上。连接并接通电源检查装置是否正常工作，断开电源。
- ④ 待 PCR 完成后取出样品，每组取 25 μ L 样品溶液与 DL2000 按组别加入泳道中，开始电泳。
- ⑤ 等待至染料到达离电泳装置正极约 1cm 时关闭电源，倒干多余缓冲液，取出凝胶用纸巾吸干并置于成像仪器下进行成像。