



酵母质粒大提试剂盒

(Yeast Plasmid HighPure Kit)

目录号: ZP111

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP111-1 (5次)	ZP111-2 (10次)	ZP111-3 (20次)
Lyticase buffer	30ml	60ml	120ml
RNaseA (10 mg/ml)	600 µl	1.2ml	2×1.2ml
溶液 1	60 ml	120ml	240ml
溶液 2	60 ml	120ml	240ml
溶液 3	60 ml	120 ml	240 ml
漂洗液 W2	30 ml	2×30 ml	4×30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	30 ml	30 ml
过滤柱 FS	5 个	10 个	20 个
吸附柱	5 个	10 个	20 个
收集管 (50 ml)	5 个	10 个	20 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件:

第一次使用前将 RNase A 加入溶液 1 中, 混匀后置于 2-8°C 保存, 可稳定保存一年以上。本试剂盒在室温 (15-25°C) 干燥条件下, 可保存 1 年; 更长时间的保存可置于 2-8°C。2-8°C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37°C 下溶解沉淀。单独包装的 RNase A 在 -20°C、Lyticase buffer 在 4°C 可稳定保存 1 年以上。

产品简介:

本试剂盒采用独特的缓冲系统, 结合传统的异丙醇沉淀方法, 可快速地获得大量高纯度的质粒 DNA。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为 100ml, 得率一般在 0.5mg~1.5mg 左右; 低拷贝质粒推荐使用量为 200ml, 得率一般在 200~400µg 左右。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液 1 在使用前先加入 RNase A (将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入), 混匀, 置于 2-8°C 保存。
2. 使用前先检查溶液 2 和溶液 3 是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀现象, 可在 37°C 水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液 2 和溶液 3, 使用后应立即盖紧盖子。
4. 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出, 避免滤膜因压力而松动。
5. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加溶液 1、2、3 的用量; 洗脱缓冲液推荐在 65~70°C 水浴中预热。

操作步骤：

1. 取 100-200 ml 培养好的酵母菌液，室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 3 分钟收集菌体。

注意：菌液较多时，可多次离心并将菌体沉淀收集到一个离心管中。

2. 酵母细胞壁的破除：

a、酶法：向菌体中加入 5ml Lyticase buffer，充分混匀，并在摇床上 220rpm/min，30℃处理 1 小时。4000 rpm(~1500×g)离心 10 分钟，弃上清，收集沉淀。加入 10ml 溶液 1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 重悬沉淀。

注意：以上 Lyticase 的用量和处理时间为经验值，根据酵母菌株和酵母细胞数量的不同，所用 Lyticase 的浓度和孵育时间应该进行适当调整。

b、玻璃珠法：向菌体中加入 5ml 溶液 1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 重悬沉淀，彻底悬浮菌体。加入 1g 直径为 0.45 - 0.55mm 的酸洗玻璃珠，涡旋振荡 10 分钟，再加入 5ml 溶液 1

3. 向离心管中加入 10ml 溶液 2，立即温和地上下翻转 6 - 8 次，充分混匀，室温放置 5 分钟。

注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量，若溶液不够粘稠，则可能是酵母菌破壁不完全导致。

4. 向离心管中加入 10ml 溶液 3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。然后室温放置 10 分钟左右。10,000 rpm (~11,500×g) 离心 5-10 分钟，将溶液全部倒入过滤柱 FS 中，慢慢推动推柄过滤，滤液收集到干净的 50ml 管中 (自备)，清液加入吸附柱中，10,000 rpm (~11,500×g)，因为溶液过多，需分两次上柱。

注意：加入溶液 3 后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤柱 FS 中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>100ml)，推荐延长离心时间至 20-30 分钟。

5. 向吸附柱中加入 7ml 漂洗液 W2 (请先检查是否已加入无水乙醇)，10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。重复此步骤一次。

6. 将吸附柱重新放回收集管中，10,000 rpm (~11,500×g) 离心 5 分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

7. 将吸附柱置于一个干净的 50ml 收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 1-2ml 洗脱缓冲液 TE，室温放置 5 分钟，室温 10,000 rpm (~11,500×g) 离心 2 分钟。将 50ml 离心管中的洗脱液全部移入一个干净的 1.5ml 离心管，-20℃保存。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 11。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液的用量主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度。若需要的浓度高一些，洗脱缓冲液体积可以少些，但是最好不少于 1ml，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

质粒 DNA 浓度及纯度检测

得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。电泳可能为多条带，这些条带是质粒的多聚体造成的，不影响后续的酶切、转染等实验。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。

纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.8~2.0 左右，可直接应用于分子生物学等常规操作。如果溶解时不使用缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值。