

## 产品简介:

本试剂盒提供了简便有效的方法,可快速提取酵母细胞中的质粒。通过离心吸附柱特异性地结合溶液中的质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料,能够高效、专一的吸附质粒 DNA,可最大限度去除蛋白及细胞中其他杂质,从而保证提取质粒的纯度。无需使用酚、氯仿等有毒有害试剂。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可用于各种分子生物学实验,如酶切、转化、测序、文库筛选、连接和转化等。

### 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 使用前先加入 RNaseA (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入),混匀,置于 2-8℃ 保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查溶液 2 和溶液 3 是否出现浑浊,如有混浊现象,可置于 37℃ 水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。
4. 溶液 2 和溶液 3 使用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心,速度为 12,000 rpm (~13,400×g)。
6. 提取的质粒量与酵母菌的培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

## 操作步骤:

1. **收集菌体:** 取 1-5 ml 酵母培养物 (不超过  $5 \times 10^7$  酵母细胞), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟, 尽量吸除上清 (菌液体积大于离心管, 可以多次离心将菌体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 300 μl **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 250 μl 溶液 1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 重悬沉淀。  
**注意:** 以上 Lyticase buffer 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 buffer 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 250 μl 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 0.1g 直径为 0.45-0.55mm 的酸洗玻璃珠, 涡旋振荡 10 分钟。
3. **裂解菌体:** 向管中加入 250 μl 溶液 2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分混匀, 室温放置 5-10 分钟。  
**注意:** 温柔混匀, 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。
4. **沉淀除杂:** 向管中加入 350 μl 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。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 20 分钟。  
**注意:** 溶液 3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。
5. 小心地将上清液加入吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟, 倒掉废液, 将吸附柱放入收集管中。
6. 向吸附柱中加入 500 μl 去蛋白液 W1, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟, 倒掉废液。

7. 向吸附柱中加入 600  $\mu$ l 漂洗液 W2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 将吸附柱放入收集管中。重复此步骤一次。

8. 将吸附柱放入收集管中置于 12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2 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。

9. 将吸附柱置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位滴加 50-100  $\mu$ l 洗脱

缓冲液 TE, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2 分钟将质粒溶液收集到离心管中。

**注意:** 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 再次离心洗脱。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。洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C, 以防 DNA 降解。

#### 补充说明:

- 通常酵母质粒拷贝数都很低, 一般通过电泳或者分光光度计法都很难检测到。提取的质粒如果用于下一步实验, 通常建议使用量为:  
可使用 1-5  $\mu$ l 用作 PCR 模板。  
可使用 5-10  $\mu$ l 用于转化大肠杆菌。
- 转化大肠杆菌时应使用商业化高转化效率的感受态细胞, 如公司的目录号为: ZC101 等产品。

## 酵母质粒小提试剂盒

### (Yeast Plasmid Miniprep Kit)

目录号: ZP107 版本: 2014-10-9

#### 试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP107-1 (50 次)	ZP107-2 (100 次)	ZP107-3 (200 次)
Lyticase buffer	15ml	30ml	60ml
RNaseA (10 mg/ml)	150 $\mu$ l	300 $\mu$ l	600 $\mu$ l
溶液 1	15 ml	30ml	60ml
溶液 2	15 ml	30ml	60ml
溶液 3	20 ml	40 ml	80 ml
去蛋白液 W1	30 ml	60 ml	120 ml
漂洗液 W2	15 ml	2 $\times$ 15 ml	2 $\times$ 30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

#### 储存条件:

本试剂盒在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 干燥条件下, 可保存 12 个月; 更长时间的保存可置于 2-8 $^{\circ}$ C。在 2-8 $^{\circ}$ C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37 $^{\circ}$ C 下溶解沉淀。溶液 1 (在加入 RNase A 后) 和 Lyticase buffer, 应置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 可稳定保存 6 个月。单独包装的 RNase A 可在 -20 $^{\circ}$ C 保存一年以上。