



## 酵母质粒中提试剂盒

### (Yeast Plasmid Midipure DNA Kit)

目录号: ZP109

#### 试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP109-1 (50 次)	ZP109-2 (100 次)	ZP109-3 (200 次)
RNaseA ( 10 mg/ml )	300 $\mu$ l	600 $\mu$ l	1200 $\mu$ l
酵母细胞悬浮液	30 ml	60ml	120ml
溶液 1	30 ml	60ml	120ml
溶液 2	30 ml	60ml	120ml
溶液 3	40 ml	80 ml	160 ml
去蛋白液 W1	30 ml	60 ml	60 ml
漂洗液 W2	15 ml	2 $\times$ 15 ml	4 $\times$ 15 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, 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。

#### 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $\times$ g)。

## 操作步骤：

1. 取 5-15 ml 培养好的酵母菌液，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
2. 酵母细胞壁的破除（本试剂盒为酶法）：
  - a. 酶法：向菌体中加入 600 μl 酵母细胞悬浮液，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 500μl 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 500μl 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. 向管中加入 500 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. 向管中加入 700 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 10 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，因为溶液过多，需两次上柱。
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 700 μl 漂洗液 W2（**请先检查是否已加入无水乙醇**），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。
8. 向吸附柱中加入 500 μl 漂洗液 W2，12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 分钟，将吸附柱放入收集管中置于 12,000 rpm (~13,400×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 μl 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2 分钟，12,000 rpm (~13,400×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，重复步骤 9。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 μl，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。**

## 补充说明：

1. 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 μl 用作 PCR 模板。  
可使用 5-10 μl 用于转化大肠杆菌。