



酵母质粒小提 试剂盒

货号:JKR23007

规格:100T

储存条件:室温(15°C-25°C)干燥保存,有效期12个月。

2°C-8°C保存时间更长。

1. 产品简介

试剂盒采用酶法破碎酵母细胞壁来提取酵母质粒DNA。所采用的酵母破壁酶能有效地破坏酵母细胞壁，提高酵母质粒DNA的产量。吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附DNA，可最大限度去除杂质蛋白质及细胞中其他有机化合物。使用本试剂盒提取的酵母质粒DNA可适用于各种常规的分子生物学实验，包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。本试剂盒无需使用酚、氯仿等有毒试剂，操作安全。

2. 试剂盒组分

| 组分 | 容量(100T) | 组分 | 容量(100T) |
|-----------|------------------|--------|----------|
| RNase A | 500 μ L | 溶液 YP3 | 40mL |
| 酵母破壁酶 | 1.4mL \times 2 | 漂洗液 | 30mL |
| 破壁 Buffer | 50mL | 洗脱液 | 10mL |
| 巯基还原剂 | 800 μ L | 吸附柱 | 100个 |
| 溶液 YP1 | 30mL | 收集管 | 100个 |
| 溶液 YP2 | 30mL | 说明书 | 1份 |

注意：使用前请先在30mL漂洗液中加入60mL无水乙醇。溶液YP1在使用前先加入RNaseA(将试剂盒中提供的RNaseA全部加入)，混匀，置于2-8 $^{\circ}$ C保存。

3. 操作步骤

1) 取1-5mL酵母培养物(不超过 5×10^7 cells)，4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min，尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多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：

向酵母菌体中加入470 μ L破壁Buffer，充分悬浮菌体，加入25 μ L酵母破壁酶和5 μ L巯基还原剂，充分混匀，37 $^{\circ}$ C处理1-2h，期间可颠倒离心管混匀数次。4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min，弃上清，收集沉淀。

3) 向沉淀中加入250 μ L溶液YP1(请先检查是否已加入RNaseA)，充分悬浮沉淀。

注意：如果菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。

4) 向离心管中加入250 μ L溶液YP2, 温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

注意: 混匀一定要温和, 以免污染细菌基因组DNA, 此时菌液应变得清亮粘稠, 作用时间不要超过5min, 以免质粒受到破坏。

5) 向离心管中加入350 μ L溶液YP3, 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。4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心10min, 用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中, 尽量不要吸出沉淀。

注意: 溶液YP3加入后应立即混合避免产生局部沉淀。如上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6) 将上一步所得上清液加入吸附柱中, 室温放置2min, 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

7) 向吸附柱中加入600 μ L漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。

8) 向吸附柱中加入600 μ L漂洗液, 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。

9) 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心2min, 将吸附柱敞口置于室温或50 $^{\circ}$ C温箱放置数分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR等。

10) 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加30-50 μ L经65 $^{\circ}$ C水浴预热的洗脱液, 室温放置2min, 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min。

注意: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中, 室温放置2min, 4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心1min。

4. 注意事项

1) 使用前请先检查溶液YP2和溶液YP3是否出现混浊, 如有混浊现象, 可在37 $^{\circ}$ C水浴中加热几分钟, 待溶液恢复澄清后再使用。

2) 洗脱缓冲液体积不应少于50 μ L, 体积过小影响回收效率; 洗脱液的pH值对洗脱效率也有影响, 若需要用水做洗脱液应保证其pH值在8.0左右(可用NaOH将水的pH值调至此范围), pH值低于7.0会降低洗脱效率; DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C, 以防DNA降解。

3) 质粒得率与酵母菌株、质粒拷贝数、培养条件等因素有关。通常酵母质粒拷贝数都很低, 一般通过电泳或分光光度计法都很难检测到, 可通过PCR或转化大肠杆菌来检测。

4) DNA浓度及纯度检测: 得到的基因组DNA片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的DNA片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA应在OD260处有显著吸收峰, OD260值为1相当于大约50 μ g/mL双链DNA、40 μ g/mL单链DNA。OD260/OD280比值应为1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为pH值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

