

版本号: DP210831

TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit

酵母质粒提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP112

产品内容

| 产品组成 | DP112-02 (50 preps) |
|-----------------------------------|------------------------|
| 平衡液BL (Buffer BL) | 30 ml |
| 溶液YP1 (Buffer YP1) | 15 ml |
| 溶液YP2 (Buffer YP2) | 15 ml |
| 溶液YP3 (Buffer YP3) | 20 ml |
| 去蛋白液PD (Buffer PD) | 30 ml |
| 漂洗液PW (Buffer PW) | 15 ml |
| 洗脱缓冲液EB (Buffer EB) | 15 ml |
| RNase A (10 mg/ml) | 150 µl |
| 吸附柱CP2 (Spin Columns CP2) | 50个 |
| 收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml) | 50个 |

储存条件

该试剂盒置于室温(15-30°C)干燥条件下,可保存15个月。若溶液产生沉淀,使用前可在37°C水浴中预热10min以溶解沉淀,不影响效果。溶液YP1加入RNase A后,应置于2-8°C,可稳定保存6个月。单独包装的RNase A可在室温保存15个月。

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新型材料，能够高效、专一的吸附质粒DNA，可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YP1使用前先加入RNaseA **(将试剂盒中提供的RNase A全部加入)**，混匀，置于2-8℃保存。
2. 使用前先检查平衡液BL、溶液YP2和YP3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。
3. 溶液YP2和YP3使用后应立即盖紧盖子。
4. 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)。
5. 提取的质粒质量与酵母菌的培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
6. 实验前使用平衡液处理吸附柱，可以充分激活硅基质膜，提高得率。
7. 用平衡液处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。

需要自备的试剂

1. Lyticase (TIANGEN公司有售，目录号：RT410)
 2. 山梨醇buffer：用0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)配制1.2 M山梨醇
0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)的配制：
77.4ml 0.1mol/L Na_2HPO_4 +22.6ml 0.1mol/L NaH_2PO_4
-

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

- 柱平衡步骤：向吸附柱CP2中（吸附柱放入收集管中）加入500 μl 的平衡液BL，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
 - 取1-5 ml酵母培养物（不超过 5×10^7 酵母细胞），12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，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）。
 - 酵母细胞壁的破除：
 - 酶法：向菌体中加入300 μl 山梨醇buffer，加入大约50 U Lyticase，充分混匀，并在摇床上220 rpm，30 $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h。4000 rpm ($\sim 1500\times g$)离心10 min，弃上清，收集沉淀。加入250 μl 溶液YP1（请先检查是否已加入RNase A）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。
 - 玻璃珠法：向菌体中加入250 μl 溶液YP1（请先检查是否已加入RNase A）重悬沉淀，彻底悬浮菌体。加入0.1g直径为0.45-0.55 mm的酸洗玻璃珠，涡旋振荡10 min。
 - 向管中加入250 μl 溶液YP2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分混匀，室温放置5-10 min。
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。
 - 向管中加入350 μl 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。12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心20 min。
注意：YP3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。
 - 小心地将上清液加入吸附柱CP2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，倒掉废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
 - 向吸附柱CP2中加入500 μl 去蛋白液PD，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，倒掉废液。
-



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

- 向吸附柱CP2中加入600 μl 漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min，倒掉废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
- 重复操作步骤8。
- 将吸附柱CP2放入收集管中置于12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心2 min，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CP2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。

- 将吸附柱CP2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EB，室温放置2 min，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心2 min将质粒溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于50 μl ，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用ddH₂O做洗脱液，并保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。且DNA产物应保存在-20°C，以防DNA降解。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。

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 μl 用作PCR模板。
 - 可使用5-10 μl 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TIANGEN公司的目录号为CB101和CB104等产品。