



Yeast Plasmid Mini Kit

酵母质粒小提试剂盒

目录号：CW0509S (50 preps)

保存条件：室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW0509S 50 preps
Buffer P1	15 mL
Buffer P2	15 mL
Buffer N3	20 mL
Buffer PS	15 mL
Buffer PB	10 mL
Buffer PW (concentrate)	10 mL
Buffer EB	10 mL
Glass Beads	2 g
RNase A (10 mg/mL)	150 μ L
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

产品简介

本试剂盒在普通碱裂解法的基础上进行了改进，玻璃珠可以有效的破除酵母细胞壁，新型硅质膜和缓冲液系统能高效专一的结合质粒DNA，同时可以最大限度去除蛋白及其他杂质，整个过程方便快捷，不需使用有毒有害试剂，可以同时处理多个样品。除适用于酵母细胞外，也可用于大肠杆菌。使用本试剂盒提取的质粒DNA可用于各种分子生物学实验，如连接、转化、测序和文库筛选等。

自备试剂：无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 加入RNase A的Buffer P1 置于2-8℃可稳定保存6个月。
2. 第一次使用前，将RNase A溶液全部加入到Buffer P1中，混匀，置于2-8℃保存。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在Buffer PW中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查Buffer P2、Buffer N3是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。
5. 注意不要直接接触Buffer P2和Buffer N3，使用后应立即盖紧盖子。
6. 提取的质粒量与酵母菌株、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，通过电泳或分光光度计法都很难检测到。

操作步骤

1. 取1-5 mL酵母培养物（最多不超过 5×10^7 个酵母细胞，一般对于酿酒酵母 $OD_{600}=1.0$ 时，相当于 $1-2 \times 10^7$ 细胞/mL）加入离心管（自备）中，12,000 rpm（ $\sim 13,400 \times g$ ）离心30秒，收集菌体沉淀，尽量吸弃上清。
2. 向菌体中加入250 μ L Buffer P1（请先检查是否已加入RNase A），重悬沉淀。
3. 在以上混合物中加入40 mg的玻璃珠（Glass Beads），涡旋震荡10分钟。
4. 向离心管中加入250 μ L Buffer P2，温和地上下颠倒混匀6-8次，室温放置5-10分钟，此时菌液应变得清亮粘稠。

注意：温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组DNA，造成提取的质粒中混有基因组DNA片段。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 向离心管中加入350 μL Buffer N3, 立即温和地上下颠倒混匀6-8次, 此时出现白色絮状沉淀, 12,000 rpm离心20分钟。
注意: Buffer N3加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。
6. 柱平衡: 向已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中加入200 μL Buffer PS, 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 将步骤5所得上清加入到已装入收集管的吸附柱中, 注意不要吸出沉淀。
注意: 吸附柱的最大容积为750 μL , 溶液分2次过柱。
8. 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
9. 向吸附柱加入150 μL Buffer PB, 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入750 μL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液。
11. 将吸附柱重新放回收集管中, 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。
注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。
12. 将吸附柱置于一个新的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加50-100 μL Buffer EB, 室温放置数分钟, 13,000 rpm离心1分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存质粒。
注意: 1) 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, 室温放置数分钟, 13,000 rpm离心1分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。
2) 质粒拷贝数较低或>10 kb时, Buffer EB在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热, 可以增加提取效率。
3) 通常酵母质粒拷贝数很低, 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: 用作PCR模板可使用1-5 μL 质粒, 用于转化大肠杆菌可使用5-10 μL 质粒。
4) 转化大肠杆菌时应使用商业化高转化效率的感受态细胞。