

Yeast Plasmid Mini Preparation Kit

酵母质粒小提试剂盒

HX3042

产品简介

酵母质粒小提试剂盒 (Yeast Plasmid Mini Preparation Kit) 是一种使用破壁酶 (Lyticase) 消化去除酵母细胞壁, 然后采用一种新型的酵母质粒纯化柱实现从酵母细胞中进行少量质粒快速抽提的试剂盒。无需酚氯仿抽提, 无需酒精沉淀, 12 个样品只需约 1-1.5 h 即可完成。试剂盒提供了破壁酶 (Lyticase), 酵母收集后, 加入 Lyticase 消化去除细胞壁, 接着采用传统碱裂法裂解细胞, 然后将获得的上清液转移至结合柱结合 DNA, 经过离心快速洗涤, 最后用洗脱液洗脱出酵母质粒 DNA。由于采用了高浓度的破壁酶, 无需再使用玻璃珠, 可以避免因为玻璃珠的机械作用带来的酵母基因组 DNA 污染。每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为 20 μg , 质粒 DNA 的产量依赖于酵母携带质粒的拷贝数, 酵母菌株以及生长条件。抽提所得质粒的量与酵母培养浓度、质粒拷贝数、酵母品系等因素有关, 通常酵母质粒的拷贝数较低, 高拷贝酵母质粒抽提时的得率会大大提高, 1.5-5 ml 培养过夜的酵母抽提获得的质粒 DNA 量约为 1-3 μg 左右。抽提得到的酵母质粒 DNA 可用于各种常规分子生物学实验, 如转化、PCR、基于 PCR 的突变、体外转录、酶切、测序、文库筛选等。

产品应用

从酵母细胞中进行少量质粒快速抽提, 抽提得到的酵母质粒 DNA 可用于各种常规分子生物学实验, 如转化、PCR、基于 PCR 的突变、体外转录、酶切、测序、文库筛选等。

储存条件

Lyticase 需 -20°C 保存, 其余室温保存, 一年有效。Lyticase 为粉末, 短时间 4°C 存放不影响其活性。Lyticase 配制成 Lyticase 溶液后 4°C 可以保存 1 个月, -20°C 可以保存 6 个月。

产品信息

组分编号	组分名称	规格
		50 T
HX3042-1	酶解缓冲液	10 ml
HX3042-2	Buffer S1 (悬浮液)	15 ml

HX3042-3	Buffer P1 (裂解液)	15 ml
HX3042-4	Buffer P2 (结合液)	20 ml
HX3042-5	Buffer WB (洗涤液, 首次使用前加入 27 ml 无水乙醇)	18 ml
HX3042-6	Buffer EB (洗脱液)	3 ml
HX3042-7	RNase A (100 mg/ml)	15 μ l
HX3042-8	Lyticase	1 管
HX3042-9	Lyticase 配制液	1.2 ml
HX3042-10	小抽质粒纯化柱及废液收集管	50 套

注意事项

1. 温度较低时, Buffer P1 和 Buffer P2 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀, 37°C 水浴加热溶解, 混匀后使用。Buffer P1 请勿过分剧烈混匀, 否则会产生大量气泡。Buffer P1 使用后, 一定要盖紧瓶盖, 防止被空气中二氧化碳酸化。Buffer P1 有强碱性, Buffer P1、Buffer P2 和 Lyticase 对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
2. 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
3. 废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。
4. **首次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到 Buffer S1 中, 混匀, 并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后 4°C 存放。**
5. **首次使用前在每瓶 Buffer WB 中加入 27 ml 无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。**
6. **首次使用前吸取 1 ml Lyticase 配制液到 Lyticase 粉末中, 完全溶解后即为 Lyticase 溶液。配制好的 Lyticase 溶液 4°C 可以保存 1 个月, -20°C 可以保存 6 个月。如需 -20°C 保存, 最好能适当分装。Lyticase 溶液配制后或冻存后再溶解可能会出现轻微混浊, 属正常现象, 请混匀后使用。**
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 取培养过夜的酵母 1.5 ml, 5000 g 离心 1 min 收集酵母沉淀, 弃上清。再重复一次, 每管共收集 3 ml 培养过夜的酵母。再在离心机快速离心一下 (5000 g 离心 1-2 sec), 用移液器小心吸尽残余液体。

注: 通常酵母宜 30°C 培养过夜 (16-24 h 左右)。建议 5000 g (~5000-6000 rpm) 室温离心 1 min, 如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密, 不利于后续加入 Buffer S1 后充分重悬沉淀。直接倒掉上清, 再倒入约 1.5 ml 酵母液并重复上述的离心操作, 然后直接倒掉上清, 再在

离心机快速离心一下 (5000 g 1-2 sec), 用移液器小心吸尽残余液体。残余液体必须吸尽, 否则可能会干扰后续的酶解反应。如果酵母密度明显偏低, 可考虑使用更多酵母液, 再重复上述操作 1-2 次。所用酵母量一般不宜超过 5 ml。过量的酵母会导致后续的酶解和碱裂解不充分。

2. 每管加入 100 μ l 酶解缓冲液, 重悬酵母沉淀。确保沉淀完全散开, 无可见酵母团块。

注: 可以通过剧烈 Vortex 来重悬沉淀。

3. 加入 20 μ l 配制好的 Lyticase 溶液, 充分混匀, 30°C 水平摇床 200-250 rpm 孵育 0.5-1 h。

注: 根据酵母菌株和酵母细胞数量的不同, 酶解的孵育时间可进行适当调整。当酵母用量较大时, 酶解的孵育时间需延长。孵育时间延长到 2-3 h 通常不会对质粒抽提带来负面影响。

4. 1500 g (~3000-4000 rpm) 离心 10 min, 弃上清, 收集沉淀。

注: 直接倒掉上清, 然后倒置于吸水纸上 (可用普通草纸), 使液体流尽。也可在直接倒掉上清后再在离心机内甩一下, 用移液器吸尽残留液体。

5. 每管加入 250 μ l Buffer S1, 重悬酵母沉淀。确保沉淀完全散开, 无可见酵母团块。

注: 确认 Buffer S1 中已经添加了 RNase A。由于此时酵母细胞壁已经去除, 重悬操作要温和, 不宜剧烈振荡, 否则会容易导致基因组 DNA 的污染。但同时必须保证沉淀充分散开, 即必须确保酵母细胞充分分散到溶液中。

6. 每管加入 250 μ l Buffer P1, 轻轻颠倒离心管 4-6 次, 使菌体完全裂解, 溶液透明。

注: 切勿 vortex! vortex 或其它剧烈操作会导致基因组 DNA 断裂, 易导致最终所得质粒被基因组 DNA 污染。遇到有少量团块或絮状物产生的情况, 可以增加颠倒次数 3-5 次, 再室温放置 2-3 min, 但总裂解时间不可超过 5 min。

7. 每管加入 350 μ l Buffer P2, 随即颠倒离心管 4-6 次混匀, 可见白色絮状物产生。

注: 切勿 vortex! 颠倒次数也不宜过多, 否则易导致最终所得质粒的质量下降。

8. 最高速 (13,000 rpm 左右) 室温离心 10 min。

注: 离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱, 废液收集管, 并在纯化柱上做好标记。

9. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心 30-60 sec, 倒弃收集管内液体。

注: 质粒倒入质粒纯化柱后, 可以不用等待, 直接离心。倒弃收集管内的液体后, 保留收集管继续使用。

10. 在质粒纯化柱内加入 750 μ l Buffer WB, 最高速离心 30-60 sec, 洗去杂质, 倒弃收集管内液体。

注: 加入 Buffer WB 后可以不用等待, 直接离心。倒弃收集管内的液体后, 保留收集管继续使用。

11. 最高速再离心 1 min, 除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注: 倒弃收集管内液体后再离心, 才能彻底去除微量的 Buffer WB。微量的 Buffer WB 会影响质粒的质量。

12. 将质粒纯化柱置于 1.5 ml 离心管上, 加入 50 μ l Buffer EB 至管内柱面上, 放置 1 min。

注: Buffer EB 需要直接加至管内柱面中央, 使液体被纯化柱吸收。如果不慎将 Buffer EB 沾在管壁上, 一定要震动管子, 使液体滑落到管底, 以便被纯化柱吸收。也可以用重蒸水或 Milli-Q 级纯水替代 Buffer EB, 但是水的 pH 应不小于 6.5。Buffer EB 加入后放置时间稍长, 对于增加质粒产量会略有帮助。

13. 最高速离心 1 min, 所得液体即为高纯度酵母质粒。