

版本号: FDI1621

FinePure Yeast Plasmid Mini Kit

FinePure 少量酵母质粒柱式提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: FD904

产品内容:

产品组成	FD904-1 (50 preps)
RNase A(10 mg/ml)	150 μ l
山梨醇 Buffer	18 ml
Buffer BL	30 ml
Buffer YP1	15 ml
Buffer YP2	15 ml
Buffer YP3	20 ml
Buffer DW	30 ml
Buffer DW2	12 ml
Buffer TB	15 ml
DNAPure MinElute Spin Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	50 个

储存条件:

本试剂盒所有的组分置于室温(15-25 $^{\circ}$ C)干燥条件下,可保存 12 个月。Buffer YP2 和 Buffer YP3 可能会有沉淀形成,使用前需在 37 $^{\circ}$ C 水浴中重新溶解,摇匀后使用。当 RNase A 加入 Buffer YP1 后,可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

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，适合从1-5 ml酵母培养物中提取质粒DNA。纯化的质粒DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。本试剂盒对Buffer YP2进行了优化，可以避免菌量极少时或者菌液过度老化时可能出现的单链质粒DNA，同时对Buffer YP3进行了优化，可以有效避免因SDS残留导致的酶切不完全或弥散、转染效率低等情况。

注意事项：

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 试剂盒中提供有 RNase A，简短离心，然后将所有 RNase A 溶液加入 Buffer YP1，混匀后置于 2–8°C 保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer DW2 中加入无水乙醇。
3. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000 rpm。
4. 使用前请先检查 Buffer YP2 和 YP3 是否出现浑浊，如有混浊现象，可在 37°C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。注意不要直接接触 Buffer YP2 和 YP3，使用后应立即盖紧盖子。
5. 提取的质粒量与酵母菌的培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

操作步骤：

使用前请先在 Buffer DW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 DNAPure MinElute Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l 的 Buffer BL，12,000 rpm 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）
2. 取 1-5 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，倒弃培养基，然后将离心管在吸水纸上轻轻拍打去尽残液。
3. 酵母细胞壁的破除：
 - a. 酶法：向菌体中加入 300 μ l 山梨醇 Buffer，加入大约 50 U Lyticase（客户自备，目录号 FA109-02），充分混匀，并在摇床上 220 rpm，30°C 处理 1 h。4,000 rpm 离心 10

min, 弃上清, 收集沉淀。加入 250 μ l 溶液 YP1 (请先检查是否已加入 RNase A) 重悬沉淀。

注意: 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 250 μ l 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 0.1 g 直径为研磨珠, 涡旋振荡 10 min。

4. 向离心管中加入 250 μ l Buffer YP2, 温和地上下颠倒混匀 8-10 次使菌体充分裂解。

注意: 轻轻颠倒混匀, 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 片断。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 min, 以免质粒受到破坏。

5. 向离心管中加入 350 μ l Buffer YP3, 立即温和地上下颠倒混匀 8-10 次, 此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 20 min, 此时在离心管底部形成沉淀。

注意: Buffer 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。

6. 将吸附柱 DNAPure MinElute Spin Columns 放入收集管中, 然后将上一步离心收集的上清液用移液器转移到吸附柱中, 注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm 离心 30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

7. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer DW, 12,000 rpm 离心 30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer DW2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

9. 重复操作步骤 8 一次。

10. 12,000 rpm 离心 3 min。

11. 将吸附柱置于新的 1.5 ml 离心管中, 加入 50-100 μ l Buffer TB 至吸附膜的中央, 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

注意: 56-70 $^{\circ}$ C 预热 TB 或去离子水(pH \geq 7.0), 可以提高洗脱效率。如果使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 \geq 7.0。