

版本号: DP130227

# TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit

## 酵母质粒小提试剂盒

(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 $\mu$ l
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(15-25 $^{\circ}$ C)干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37 $^{\circ}$ C水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。溶液YP1加入RNase A后, 应置于2-8 $^{\circ}$ C, 可稳定保存6个月。单独包装的RNase A可在室温保存12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特有新型材料，能够高效、专一的吸附质粒DNA，可最大限度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°C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°C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，可以最大限度激活硅基质膜，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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ +22.6ml 0.1mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
-

---

## 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。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱CP2中（吸附柱放入收集管中）加入500  $\mu\text{l}$ 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）
  2. 取1-5 ml酵母培养物（不超过 $5 \times 10^7$ 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）。
  3. 酵母细胞壁的破除：
    - a、酶法：向菌体中加入300  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ 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。
    - b、玻璃珠法：向菌体中加入250  $\mu\text{l}$ 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0.1g直径为0.45-0.55 mm的酸洗玻璃珠，涡旋振荡10 min。
  4. 向管中加入250  $\mu\text{l}$ 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。
  5. 向管中加入350  $\mu\text{l}$ 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。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。
  6. 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。
  7. 向吸附柱CP2中加入500  $\mu\text{l}$ 缓冲液PD，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心1 min，倒掉废液。
-

- 
- 向吸附柱CP2中加入600  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{l}$ ，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ddH<sub>2</sub>O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 $^{\circ}\text{C}$ ，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  $\mu\text{l}$  用作PCR模板。  
可使用5-10  $\mu\text{l}$  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。
-