

酵母质粒提取试剂盒

70201ES

产品使用说明书

Ver. CN20231027

目录

产品简介	1
组分信息	1
储存条件	1
操作步骤	1
注意事项	2
相关试剂推荐	2

产品简介

试剂盒采用酶法破碎酵母细胞壁来提取酵母质粒 DNA。所采用的酵母破壁酶能有效地破坏酵母细胞壁，提高酵母质粒 DNA 的产量。吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白质及细胞中其他有机化合物。使用本试剂盒提取的酵母质粒 DNA 可适用于各种常规的分子生物学实验，包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。本试剂盒无需使用酚、氯仿等有毒试剂，操作安全。

组分信息

组分编号	组分名称	保存温度	70201ES50	70201ES60
70201-A	RNase A	2~8°C	250 µL	500 µL
70201-B	酵母破壁酶	2~8°C	1.4 mL	1.4 mL×2
70201-C	破壁 Buffer	2~8°C	25 mL	50 mL
70201-D	巯基还原剂	2~8°C	400 µL	800 µL
70201-E	溶液 YP1	室温	15 mL	30 mL
70201-F	溶液 YP2	室温	15 mL	30 mL
70201-G	溶液 YP3	室温	20 mL	40 mL
70201-H	漂洗液	室温	15 mL	15 mL×2
70201-I	洗脱液	室温	5 mL	10 mL
70201-J	吸附柱	室温	60 个	120 个
70201-K	收集管	室温	60 个	120 个

注意:使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇,加入体积请参照瓶体上的标签。溶液 YP1 在使用前先加入 RNaseA(将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入),混匀,置于 2-8°C 保存。

备注:组分 70201-A RNase A 为翌圣生物 10405ES RNase A 产品;组分 70201-B 酵母破壁酶为翌圣生物 10404ES Snailase 蜗牛酶产品。

储存条件

2~8 °C 干燥保存,有效期 2 年。

操作步骤

1. 取 1-5 mL 酵母培养物(不超过 5×10^7 cells), 12000 rpm 离心 1 min, 尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
2. 酵母细胞壁的破除: 向酵母菌体中加入 470 µL 破壁 Buffer, 充分悬浮菌体, 加入 25 µL 酵母破壁酶和 5 µL 巯基还原剂, 充分混匀, 37 °C 处理 1-2 h, 期间可颠倒离心管混匀数次。12000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 收集沉淀。
3. 向沉淀中加入 250 µL 溶液 YP1(请先检查是否已加入 RNase A), 充分悬浮沉淀。
注意: 如果菌块未彻底混匀, 会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
4. 向离心管中加入 250 µL 溶液 YP2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
注意: 混匀一定要温和, 以免污染细菌基因组 DNA, 此时菌液应变得清亮粘稠, 作用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。
5. 向离心管中加入 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。12000 rpm 离心 10 min, 用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中, 尽量不要吸出沉淀。

注意: 溶液 YP3 加入后应立即混合避免产生局部沉淀。如上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6. 将上一步所得上清液加入吸附柱中, 室温放置 2 min, 12000 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。
7. 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
8. 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液, 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
9. 12000 rpm 离心 2 min, 将吸附柱敞口置于室温或 50 $^{\circ}$ C 温箱放置数分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR 等。
10. 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加 30-50 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱液, 室温放置 2min, 12000 rpm 离心 1 min。
11. 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中, 室温放置 2 min, 12000 rpm 离心 1min。

注意事项

1. 使用前请先检查溶液 YP2 和溶液 YP3 是否出现混浊, 如有混浊现象, 可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中加热几分钟, 待溶液恢复澄清后再使用。
2. 洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ L, 体积过小影响回收效率; 洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响, 若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; DNA 产物应保存在 -25~-15 $^{\circ}$ C, 以防 DNA 降解。
3. 质粒得率与酵母菌株、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, 一般通过电泳或分光光度计法都很难检测到, 可通过 PCR 或转化大肠杆菌来检测。
4. DNA 浓度及纯度检测: 得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰, OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL 双链 DNA、40 μ g/mL 单链 DNA。OD260 /OD280 比值应为 1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。

相关试剂推荐

翌圣货号	产品名称
10404ES	Snailase 蜗牛酶(酵母细胞破壁酶)
10405ES	RNase A(10 mg/mL)
10903ES	X- α -Gal 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃半乳糖苷
11741ES	GAL4 GFP Reporter Plasmid(GAL4-GFP 报告基因质粒)
60231ES	Aureobasidin A(AbA)金担子素 A
70202ES	酵母核体系双杂交试剂盒



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐