

酵母质粒小提试剂盒

项目号: Y666144

储存条件: 室温。

产品内容

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| 组分 | / |
| Buffer P1 | 15ml |
| Buffer P2 | 15ml |
| Buffer N3 | 20ml |
| Buffer PS | 15ml |
| Buffer PB | 10ml |
| Buffer PW (concentrate) | 10ml |
| Buffer EB | 10ml |
| Glass Beads | 2g |
| 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, 新型硅基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: β -巯基乙醇、无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温 (15-30°C) 环境稳定保存 1 年, 将吸附柱置于 2-8°C 可保存更长时间, 加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8°C 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°C 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°C 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, $12,000\text{rpm}$ ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒, 收集菌体沉淀, 尽量吸弃上清。
2. 向菌体中加入 $250 \mu\text{l}$ 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 40mg 的玻璃珠 (Glass Beads), 涡旋震荡 10 分钟。
4. 向离心管中加入 $250 \mu\text{l}$ 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 $350 \mu\text{l}$ 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, $12,000\text{rpm}$ 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 $200 \mu\text{l}$ Buffer PS, $12,000\text{rpm}$ 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 $750 \mu\text{l}$, 溶液分 2 次过柱。

8. $12,000\text{rpm}$ 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 $150 \mu\text{l}$ Buffer PB, $12,000\text{rpm}$ 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 $750 \mu\text{l}$ Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), $12,000\text{rpm}$ 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, $12,000\text{rpm}$ 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 $50-100 \mu\text{l}$ Buffer EB, 室温放置数分钟, $13,000\text{rpm}$ 离心 1 分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。 -20°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, $13,000\text{rpm}$ 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 $>10\text{ kb}$ 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 $1-5 \mu\text{l}$ 质粒, 用于转化大肠杆菌可使用 $5-10 \mu\text{l}$ 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。