



Yeast Plasmid Mini Kit

酵母质粒小量提取试剂盒

产品简介:

GBC 小量抽提试剂盒(Yeast Plasmid Mini Kit)采用了一种新型的硅胶柱。在特定条件下,使质粒能在离心过柱的瞬间,结合到质粒纯化柱上,在一定条件下又能将质粒充分洗脱,从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提,无需酒精沉淀,12个样品只需不足30分钟即可完成。所得质粒质量会受质粒拷贝数等因素影响,所得的质粒可直接用于转细胞,DNA测序,PCR,基于PCR的突变,转化细菌,内切酶消化。

包装清单

产品编号	63101	P6105	P6106
次数	5	50	100
纯化柱子	5	50	100
收集管	5	50	100
YP I	2ml	20ml	30 ml
YP II	2ml	20 ml	30 ml
YP III	2ml	25 ml	40 ml
Buffer WB	3ml	30 ml	55 ml
DNA Wash Buffer	2ml	20 ml	2x20 ml
RNase A	--	50ul	100ul
说明书	1	1	1

保存条件

室温保存,一年有效。

注意事项

- 第一次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到 YP I 中,混匀,并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后 4℃ 存放。P6101 已含有 RNaseA。
- 第一次使用前在 P6101 中 DNA Wash Buffer 每瓶加入 8ml 无水乙醇;P6105 与 P6106 中,每瓶 DNA wash Buffer 加入 80ml 乙醇。
- 温度较低时,YP II 和 YP III 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀,37℃ 水浴加热溶解,混匀后使用。YP II 请勿过分剧烈混匀,否则会产生大量气泡。
- YP II 使用完后,一定要盖紧瓶盖,防止被空气中二氧化碳酸化。
- YP II 有强碱性,YP II 和 YP III 对人体都有刺激性,操作时请小心,并注意适当防护。
- 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。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

需要自备的试剂

- 1. Lyticase (GBCBIO 目录号 S3862) 或使用蜗牛酶替代。
- 2. SE Buffer: 1M Sorbitol
50mM Tris pH 7.5
10mM EDTA



操作流程

1. 取 1-5 ml 酵母培养物(不超过 5×10^7 酵母细胞), 12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 分钟, 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)。
2. 酵母细胞壁的破除:
 - a. 酶法: 向菌体中加入 300 μl SE Buffer, 加入大约 50 U Lyticase, 充分混匀, 并在摇床上 220rpm/min, 30°C 处理 1 小时。4000 rpm(~1500×g)离心 10 分钟, 弃上清, 收集沉淀。加入 250μl 溶液 YP1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 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. 机械法: 向菌体中加入 250μl 溶液 YP1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 重悬沉淀, 彻底悬浮菌体。加入 0.1g 直径为 0.45–0.55mm 的酸洗玻璃珠, 涡旋振荡 10 分钟。
3. 加入 250μl YP II, 轻轻颠倒离心管 4-6 次, 使细菌完全裂解, 溶液透明。室温放置 2-4 分钟。
切勿剧烈操作, 否则会导致基因组 DNA 断裂, 易导致最终所得质粒被基因组 DNA 污染。颠倒 4-6 次后, 溶液应变得透明, 无团块或絮状物。
4. 加入 350μl YP III, 随即颠倒离心管 4-6 次混匀, 可见白色絮状物产生。
切勿涡旋! 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。
5. 最高速(12000rpm 左右)室温离心 10 分钟。
6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到 GBC 柱内。最高速离心 30-60 秒, 倒弃收集管内液体。
7. 在 GBC 柱内加入 500μl Buffer WB, 最高速离心 30-60 秒, 洗去杂质, 倒弃收集管内液体。
如果下游的应用对纯度要求不高, 此步可以跳过, 如应用与酶切等。
8. 在 GBC 柱内加入 680μl DNA Wash Buffer, 最高速离心 30-60 秒, 洗去杂质, 倒弃收集管内液体。
注意: 确保 DNA Wash Buffer 已按前面的要求加入无水乙醇。
9. 可选步骤: 重复第八步用 680μl DNA wash Buffer 洗涤一次。
10. 最高速再离心 1 分钟, 除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。
注意: 倒弃收集管内液体后再离心, 此步不能忽略。
11. 将质粒纯化柱置于 1.5 毫升离心管上, 加入 50μl TE 或灭菌去离子水至纯化柱上, 放置 1 分钟。
TE 需要直接加至纯化柱面中央, 使液体被膜吸收。TE 加入后放置时间稍长, 对于增加质粒产量会略有帮助。
12. 最高速离心 1 分钟, 所得液体即为高纯度质粒。