

酵母质粒提取试剂盒说明书

货号：D1160

规格：50T/ 100T

保存：室温（15℃-25℃）干燥保存，复检期为 12 个月。2℃-8℃保存时间更长。

试剂盒组成	D1160-50T	D1160-100T
RNase A	300μL	500μL
酵母破壁酶	1.25mL	1.25mL×2
山梨醇 Buffer	25mL	50mL
巯基还原剂	300μL	600μL
溶液 YP1	15mL	30mL
溶液 YP2	15mL	30mL
溶液 YP3	20mL	40mL
漂洗液 I	24ml	48ml
漂洗液 II	15mL	15mL×2
洗脱液	15mL	30mL
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 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。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℃保存。如非指明，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

产品简介：

试剂盒采用酶法破碎酵母细胞壁和碱裂解法裂解酵母细胞来提取酵母质粒 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。

操作步骤（仅供参考）：

1、取 1-5mL 酵母培养物（不超过 5×10^7 cells），12000rpm 离心 1min，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：

A、酶法：向酵母菌体中加入 470μL 山梨醇 Buffer，充分悬浮菌体，加入 25μL 酵母破壁酶和 5μL 巯基还原剂，充分混匀，30℃处理 1-2h，期间可颠倒离心管混匀数次。12000rpm 离心 1min，弃上清，收集沉淀。向沉淀中加入 250μL YP1（请先检查是否已加入 RNaseA），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。

B、玻璃珠法：向酵母菌体中加入 250μL YP1（请先检查是否已加入 RNaseA），充分悬浮沉淀。加入 150-200μL 酸洗玻璃珠（自备），漩涡振荡 10min。简短离心使玻璃珠沉降到离心管底，吸取

上清（如上清有所损失，请用 YP 1 补足至 250 μ L）于另一干净离心管中。

3、向离心管中加入 250 μ L 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，以免污染酵母基因组 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。

4、向离心管中加入 350 μ L 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。12000rpm 离心 20 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：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。

5、将上一步所得上清液加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6、向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液 I (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，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 II (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、重复操作步骤 7。

9、12000rpm 离心 2min，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 50-200 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

11、(可选)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 2min，12000rpm 离心 1min。

注意事项：

1、使用前请先检查 YP2 和 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 -20 $^{\circ}$ 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：

R1020	酵母破壁酶溶液
D1900	酵母基因组 DNA 提取试剂盒
T1060	50 $\times$ TAE 缓冲液
G8142	GoldView II 型核酸染色剂(5000 $\times$)