

## 酵母质粒小提试剂盒

货号: NG207S 100次  
NG207M 200次

试剂盒组成	保存	100次	200次
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	300 μl	500 μl
溶液 YS1	4°C	25 ml	50ml
溶液 YS2	室温	25 ml	50ml
溶液 YS3	室温	40 ml	80 ml
漂洗液 PE	室温	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	20 ml
溶菌酶	4°C	25 mg	50mg
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

### 储存事项:

- 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 YS1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8°C 保存。如果溶液 YS1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 YS1 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 YS2 可能会析出浑浊或者沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

### 需自备试剂:

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: 77.4 ml 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 22.6ml 0.1mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 取 15 ml 山梨醇 buffer 溶解溶菌酶, 也可每次试验根据需要按次加。

### 产品介绍:

本品采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下结合溶液中的质粒 DNA, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

### 产品特点:

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
- 独有的去蛋白液配方, 可以高效去除残留的核酸酶, 即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除, 有效防止了质粒被核酸酶降解。
- 快速、方便, 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好, 可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

### 注意事项

- 所有的离心步骤均在室温完成, 离心机转速需达到 13,000rpm。
- 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50μg/ml DNA。电泳可能为单一条带, 也可能为 2 条或者多条 DNA 条带, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成, 与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
- 质粒 DNA 确切分子大小, 必须酶切线性化后, 对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知道其确切大小。
- 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱, 但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在 -20°C。质粒 DNA 如果需要长期保存, 可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 但是 EDTA 可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

**操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

## 提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 YS1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 取 1-5 ml 酵母培养物，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min，尽量吸除上清。
2. 向菌体中加入 300 μl 山梨醇 buffer，加入大约 0.5 mg 溶菌酶，充分混匀。30°C 处理 30 min。4000 rpm (~1500×g) 离心 10 min，弃上清，收集沉淀。
3. 用 250 μl 溶液 YS1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。  
如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

4. 加 250 μl 的溶液 YS2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4 分钟。  
温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。

5. 加 350 μl 溶液 YS3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。

加入溶液 YS3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

6. 将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。

7. 可选步骤加入 500 μl 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃废液。  
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 加入 600 μl 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

9. 加入 600 μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-100 μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 30 μl，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。