



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

酵母质粒小量抽提试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0029	酵母质粒小量抽提试剂盒	50次

产品简介:

- 碧云天生产的酵母质粒小量提取试剂盒(Yeast Plasmid Mini Preparation Kit)是一种使用破壁酶(Lyticase)消化去除酵母细胞壁，然后采用一种新型的酵母质粒纯化柱实现从酵母细胞中进行小量质粒快速抽提的试剂盒。
- 无需酚氯仿抽提，无需酒精沉淀，12个样品只需约1-1.5小时即可完成。
- 试剂盒提供了破壁酶(Lyticase)，酵母收集后，加入Lyticase消化去除细胞壁，接着采用传统碱裂法裂解细胞，然后将获得的上清液转移至结合柱结合DNA，经过离心快速洗涤，最后用洗脱液洗脱出酵母质粒DNA。
- 由于采用了高浓度的破壁酶，无需再使用玻璃珠，可以避免因为玻璃珠的机械作用带来的酵母基因组DNA污染。
- 每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为20微克。质粒DNA的产量依赖于酵母携带质粒的拷贝数，酵母菌株以及生长条件。通常酵母质粒的拷贝数较低，1.5-5ml培养过夜的酵母抽提获得的质粒DNA量约为1-3 微克左右。高拷贝酵母质粒抽提时的得率会大大提高。抽提所得质粒的量与酵母培养浓度、质粒拷贝数、酵母品系等因素有关。
- 使用本试剂盒抽提得到的酵母质粒DNA可用于各种常规分子生物学实验，如转化、PCR、基于PCR的突变、体外转录、酶切、测序、文库筛选等。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0029-1	酶解缓冲液	10ml
D0029-2	溶液I (悬浮液)	15ml
D0029-3	溶液II (裂解液)	15ml
D0029-4	溶液III (结合液)	20ml
D0029-5	溶液IV (洗涤液)	18ml (第一次使用前每瓶加入27ml无水乙醇)
D0029-6	溶液V (洗脱液)	3ml
D0029-7	RNase A (100mg/ml)	15μl
D0029-8	Lyticase	1管
D0029-9	Lyticase配制液	1.2ml
D0029-10	小抽质粒纯化柱及废液收集管	50套
—	说明书	1份

保存条件:

D0029-8需-20℃保存，其余室温保存，一年有效。D0029-8为粉末，短时间4℃存放不影响其活性。D0029-8配制成Lyticase溶液后4℃可以保存1个月，-20℃可以保存6个月。

注意事项:

- 第一次使用前把试剂盒提供的RNase A全部加到溶液I (悬浮液)中，混匀，并在瓶上做好标记。加入RNase A后4℃存放。
- 第一次使用前在每瓶溶液IV (洗涤液)中加入27ml无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。
- 第一次使用前吸取1ml Lyticase配制液到Lyticase粉末中，完全溶解后即为Lyticase溶液。配制好的Lyticase溶液4℃可以保存1个月，-20℃可以保存6个月。如需-20℃保存，最好能适当分装。Lyticase溶液配制后或冻存后再溶解可能会出现轻微混浊，属正常现象，请混匀后使用。
- 温度较低时，溶液II和溶液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。溶液II请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡。
- 溶液II使用完后，一定要盖紧瓶盖，防止被空气中二氧化碳酸化。
- 溶液II有强碱性，溶液II、溶液III和Lyticase对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 1. 取培养过夜的酵母1.5毫升，5000g离心1分钟收集酵母沉淀，弃上清。再重复一次，每管共收集3毫升培养过夜的酵母。再在离心机快速离心一下(5000g离心1-2秒)，用移液器小心吸尽残余液体。**

通常酵母宜30°C培养过夜(16-24小时左右)。建议5000g(~5000-6000rpm)室温离心1分钟，如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于后续加入溶液I后充分重悬沉淀。直接倒掉上清，再倒入约1.5毫升酵母液并重复上述的离心操作，然后直接倒掉上清，再在离心机快速离心一下(5000g 1-2秒)，用移液器小心吸尽残余液体。残余液体必须吸尽，否则可能会干扰后续的酶解反应。如果酵母密度明显偏低，可考虑使用更多酵母液，再重复上述操作1-2次。所用酵母量一般不宜超过5ml。过量的酵母会导致后续的酶解和碱裂解不充分。
- 2. 每管加入100微升酶解缓冲液，重悬酵母沉淀。确保沉淀完全散开，无可见酵母团块。**

可以通过剧烈Vortex来重悬沉淀。
- 3. 加入20微升配制好的Lyticase溶液，充分混匀，30°C水平摇床200-250rpm孵育0.5-1小时。**

注意：根据酵母菌株和酵母细胞数量的不同，酶解的孵育时间可进行适当调整。当酵母用量较大时，酶解的孵育时间需延长。孵育时间延长到2-3小时通常不会对质粒抽提带来负面影响。
- 4. 1500g (~3000-4000rpm)离心10分钟，弃上清，收集沉淀。**

直接倒掉上清，然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸)，使液体流尽。也可在直接倒掉上清后再在离心机内甩一下，用移液器吸尽残留液体。不同离心机因离心半径的不同g和rpm的换算值有所不同。
- 5. 每管加入250微升溶液I，重悬酵母沉淀。确保沉淀完全散开，无可见酵母团块。**

确认溶液I中已经添加了RNase A。由于此时酵母细胞壁已经去除，重悬操作要温和，不宜剧烈振荡，否则会容易导致基因组DNA的污染。但同时必须保证沉淀充分散开，即必须确保酵母细胞充分分散到溶液中。
- 6. 每管加入250微升溶液II，轻轻颠倒离心管4-6次，使菌体完全裂解，溶液透明。**

切勿vortex! vortex或其它剧烈操作会导致基因组DNA断裂，易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数3-5次，再室温放置2-3分钟，但总裂解时间不可超过5分钟。
- 7. 每管加入350微升溶液III，随即颠倒离心管4-6次混匀，可见白色絮状物产生。**

切勿vortex! 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。
- 8. 最高速(13,000rpm左右)室温离心10分钟。**

离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱，废液收集管，并在纯化柱上做好标记。
- 9. 将上一步离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心30-60秒，倒弃收集管内液体。**

质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。
- 10. 在质粒纯化柱内加入750微升溶液IV，最高速离心30-60秒，洗去杂质，倒弃收集管内液体。**

加入溶液IV后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。
- 11. 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，才能彻底去除微量的溶液IV。微量的溶液IV会影响质粒的质量。
- 12. 将质粒纯化柱置于1.5毫升离心管上，加入50微升溶液V至管内柱面上，放置1分钟。**

溶液V需要直接加至管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果不慎将溶液V沾在管壁上，一定要震动管子，使液体滑落到管底，以便被纯化柱吸收。也可以用重蒸水或Milli-Q级纯水替代溶液V，但是水的pH应不小于6.5。溶液V加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。
- 13. 最高速离心1分钟，所得液体即为高纯度酵母质粒。**

使用本产品的文献：

1. Wang M, Wang L, Guo Y, Sun R, Yue F, Yi Q, Song L. The broad pattern recognition spectrum of the Toll-like receptor in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol*. 2015 Oct;52(2):192-201.
2. Wang Z, Yu X, Niu X, Yang J, Tang Y, Hu J, Diao Y. Screening of the proteins interacting with NS1 of TMUV by yeast two-hybrid system and the identification of the function of the interacted protein. *Infect Genet Evol*. 2018 Sep;63:277-284
3. Wang Y, Zhang S, Tang Y, Diao Y. Screening of Duck Tembusu Virus NS3 Interacting Host Proteins and Identification of Its Specific Interplay Domains. *VIRUSES-BASEL*. 2019 Aug 12;11(8). pii: E740
4. Hui Wang, Wenrui Zhang, Rujiao Liu, Jiaoyun Zheng, Xueping Yao, Hui Chen, Jie Wang, Horst Christian Weber, Xiaoqun Qin, Yang Xiang, Chi Liu, Huijun Liu, Lang Pan, Xiangping Qu. Lack of bombesin receptor-activated protein attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Life Sci Alliance*. 2022 Jul 12;5(11):e202201368.

Version 2024.03.12