

酵母质粒小量提取试剂盒

产品货号：26232

产品规格：50T/100T

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。

产品组成：

试剂盒内容	50T	100T
RNase A	300ul	500ul
酵母破壁酶	1.25ml	1.25ml×2
山梨醇Buffer	25ml	50ml
巯基还原剂	300ul	600ul
溶液YP1	15ml	30ml
溶液YP2	15ml	30ml
溶液YP3	20ml	40ml
漂洗液	15ml	15ml×2
洗脱液	15ml	30ml
吸附柱	50个	100个
收集管	50个	100个
说明书	1份	1份

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。

操作步骤(仅供参考)：

- 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）。
- 酵母细胞壁的破除：
 - 酶法：**向酵母菌体中加入470ul山梨醇Buffer，充分悬浮菌体，加入25ul酵母破壁酶和5ul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250ulYP1（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。
 - 玻璃珠法：**向酵母菌体中加入250ul YP1（请先检查是否已加入RNaseA），充分悬浮沉淀。加入150-200ul 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YP1补足至250ul）于另一干净离心管中。
- 向离心管中加入250ul 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，以免污染细菌



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

基因组DNA，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过5min，以免质粒受到破坏。

4. 向离心管中加入350ul 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10min，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600ul漂洗液(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。
7. 向吸附柱中加入600ul漂洗液，12000rpm离心1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
8. 12000rpm离心2min，将吸附柱敞口置于室温或50℃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。
9. 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50-200ul经65℃水浴预热的洗脱液，室温放置2min，12000rpm离心1min。
10. 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℃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50ul，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℃，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 μg/ml双链DNA、40μg/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。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com