

酵母质粒 DNA 小量提取试剂盒

产品组分

组分	N1061	N1062	N1063
RNaseA	150 µl	300 µl	600 µl
溶液 Y I	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 Y II	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 Y III	20 ml	40 ml	80 ml
溶液 PB	30ml	50ml	100 ml
溶液 W	30 ml	30 ml×2	40 ml×3
溶液 Eluent	5 ml	10 ml	20 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

- RNaseA 的浓度为 10 mg/ml。
- 溶液 W 初次使用前用无水乙醇按 1: 1.5 稀释，即含 60%乙醇。
- 溶液 II、溶液 III、溶液 PB 中含有碱及蛋白变性剂，请不要直接接触皮肤。
- 上述产品组分均可单独购买，详见产品索引。
- 本试剂盒需单独购买试剂：溶壁酶（N9031/N9032）。

产品说明

本产品采用了经典的硅胶膜及碱裂法技术，用于酵母质粒 DNA 小量纯化。纯化原理是用溶壁酶消化酵母细胞的细胞壁，碱裂解酵母细胞后，硅胶膜柱高效可逆地吸附体系中的质粒 DNA（高盐、低 pH 值），蛋白及其它杂质不被吸附而被除去，被吸附的 DNA 在低盐、高 pH 值条件下再被洗脱纯化。一次可从 1-5 ml（不超过 5×10^7 个）的过夜培养的酵母菌液中纯化高纯度质粒 DNA（ $OD_{260/280} = 1.7-1.9$ ），此质粒 DNA 可直接用于 DNA 序列分析以及各种酶促反应等。

质量控制

从酵母中提取 pBI121 质粒 DNA。提取的质粒 DNA 质量通过琼脂糖凝胶电泳、限制性酶切和序列测定分析。

保存条件

RNase A: 可室温保存 1 年以上。RNase A 为浑浊溶液。初次使用本试剂盒时，请将 RNase A 全部加入到溶液 I 中，均匀混合后于 4℃ 保存。可保存 6 个月。

其他试剂：室温保存。

若溶液 II 出现沉淀，请于 37℃ 保温溶解。待恢复至室温后使用。沉淀的出现不会影响质粒 DNA 的纯化结果。

注意事项

- 溶壁酶（N9031/N9032）需要客户另行购买。
100 ml 溶壁酶反应缓冲液：77.4 ml 0.1M Na_2HPO_4 + 22.6 ml 0.1M NaH_2PO_4 + 21.84 g 山梨醇（pH7.0）。
- 通常酵母质粒拷贝数都很低，一般通过电泳或者分光光度计法都很难检测到。提取的质粒 DNA 如用于下列实验，通常建议使用量为：
用作 PCR 模板：1-5 µl 质粒 DNA。
转化大肠杆菌：5-10 µl 质粒 DNA。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000 rpm（约 $13,400 \times g$ ）。
- 溶液 Eluent（10 mM Tris-HCl, pH 8.5）中不含 EDTA，其收集的 DNA 片段可直接用于各种酶促反应等，不会影响后续试验。
- 为了保证回收效率，请不要使用未调整 pH 值的超纯水洗脱目的片段。

操作步骤

- 1 取酵母细胞液 1-5 ml (最多不超过 5×10^7 个)。12,000 离心 1min, 尽量去除上清。
- 2 向菌体中加入 300 μ l 溶壁酶反应缓冲液和 50 U 溶壁酶, 漩涡振荡直至菌体完全悬浮。在摇床上 220 rpm/min, 30 $^{\circ}$ C 处理 1 小时。
 - 根据酵母菌株和数量的不同, 所用溶壁酶用量和孵育时间应该进行适当调整。
- 3 5,000 rpm 离心 10min, 去上清, 收集沉淀。
- 4 加入 250 μ l 溶液 Y I /RNase A 混合液, 漩涡剧烈振荡直至菌体完全悬浮。室温静置 1-2min。
 - 初次使用本试剂盒时, 请将 RNase A 全部加入到溶液 Y I 中, 均匀混合后于 4 $^{\circ}$ C 保存。可保存 6 个月。
 - 不要残留细小菌块。菌体悬浮充分与否将决定质粒 DNA 得率的高低。
 - 室温静置 1-2 min 是为使溶液中的 RNA 被充分降解。
- 5 加入 250 μ l 溶液 Y II, 轻柔地反复颠倒混匀 5-6 次。室温放置 1-2 min, 使菌体充分裂解, 直至形成澄清的裂解溶液。
 - 若溶液 Y II 出现沉淀, 请于 37 $^{\circ}$ C 保温溶解。待恢复至室温后使用。沉淀的出现 不会影响质粒 DNA 的纯化结果。
 - 不可剧烈混和, 否则会使染色体 DNA 断裂。
 - 此步骤不宜超过 5 min。
- 6 加入 350 μ l 溶液 YIII, 立即轻柔地反复颠倒混匀 5-6 次。此时会出现白色絮状沉淀。
- 7 12,000 rpm 室温离心 10 min, 收集上清。
- 8 将上清置于 DNA 纯化柱中, 静置 1-2 min。
 - 如果收集的上清液过多, 超过 DNA 纯化柱容积 (800 μ l), 可将上清分次加入 DNA 纯化柱中。
- 9 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
 - 此时质粒 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱的硅胶膜上。
- 10 加入 500 μ l 溶液 PB, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
 - 此步骤的作用是将硅胶膜上吸附的蛋白、盐等杂质洗脱, 以获得高质量质粒 DNA。
- 11 加入 500 μ l 溶液 W, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
 - 溶液 W 初次使用前用无水乙醇按 1: 1.5 稀释, 即含 60% 乙醇。
- 12 加入 500 μ l 溶液 W, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 13 12,000 rpm 离心 3min, 以彻底去除纯化柱中残留的液体。
- 14 将 DNA 纯化柱置于新的离心管中。向纯化柱中央处, 悬空滴加 50-100 μ l 溶液 Eluent, 室温放置 2 min。
- 15 12,000 rpm 离心 1 min, 管底即为高纯度质粒 DNA。质粒 DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
 - 溶液 Eluent 可用无菌双蒸水代替, 但其 pH 需为 8.0-8.5。溶液 Eluent 的加入体积视质粒拷贝数多少、用户对 质粒浓度要求而定。
 - 对溶液 Eluent 60 $^{\circ}$ C 预热, 会提高提取质粒的产量。

Q&A

问: 加入溶液 Y II 后溶菌液不澄清, 为什么?

答: 1 菌体量过多, 溶菌不充分;

2 菌体沉淀悬浮不充分, 在加入溶液 I 后, 应使用振荡器等进行剧烈振荡使菌体沉淀充分悬浮后再做溶菌处理。

问: 质粒 DNA 测序结果不佳, 为什么?

答: 1 质粒 DNA 纯度不好, 请严格遵照实验操作要求, 使用新鲜菌体培养液进行定量。

2 进行 DNA 洗脱时用灭菌的超纯水 (P9021/P9022)。

3 DNA 插入片段本身立体建构复杂, 如 GC rich、重复序列等, 应改进测序方法。