

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com



产品简介

MesGen Biotech生产的酵母质粒小量提取试剂盒(Yeast Plasmid Miniprep 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 γ 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。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 γ 切、测序、文库筛选等。

试剂盒组成

产品组成	MPD8000-50T	MPD8000-100T	MPD8000-250T
Solution EL	10ml	20ml	25ml
Solution I	15ml	30ml	75ml
Solution II	15ml	30ml	75ml
Solution III	20ml	40ml	100ml
DNA Wash Buffer	12ml (Add 48ml ethanol)	24ml (Add 96ml ethanol)	60ml (Add 240ml ethanol)
Elution Buffer	10ml	20ml	50ml
RNase A	150 μ l	300 μ l	750 μ l
Lyticase	1 tube	1 tube	1 tube
Lyticase Buffer	1.2ml	2.4ml	6.0ml
吸附柱	50个	100个	250个
收集管	50个	100个	250个

储存条件

试剂盒可置于室温 (15-25°C) 干燥条件下,可保存12个月,更长时间的保存可置于4°C。

注意:第一次使用前将RNase A加入Solution I中混匀后建议置于4°C保存;Solution III 建议置于4°C保存;Lyticase 和 RNase A 置于-20°C。

注意事项

- Solution I** 在使用前应先加入RNase A (将试剂盒中提供的RNase A全部加入),混匀后4°C保存。
- Solution II** 如有混浊现象,可在37°C水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。使用后应立即盖紧盖子,以避免空气中的CO₂与**Solution II** 中的NaOH反应,从而造成溶液裂解效率下降。
- DNA Wash Buffer** 在使用前先加入无水乙醇(按试剂盒包装规定的体积加入)。
- 第一次使用前吸取1ml **Lyticase Buffer**到Lyticase粉末中,完全溶解后即为Lyticase溶液。配制好的Lyticase溶液4°C可以保存1个月,-20°C可以保存6个月。如需-20°C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。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心。

操作方法

1. 取培养过夜的酵母1.5ml, 5000rpm离心1min收集酵母沉淀, 弃上清。再重复一次, 每管共收集3ml培养过夜的酵母。再在离心机快速离心一下(5000g离心1-2 sec), 用移液器小心吸尽残余液体。通常酵母宜30°C培养过夜(16-24h左右)。建议5000rpm室温离心1min, 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**Solution I**后充分重悬沉淀。直接倒掉上清, 再倒入约1.5ml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(5000rpm 1-2 sec), 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100µl **Solution EL**, 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20µl配制好的**Lyticase溶液**, 充分混匀, 30°C水平摇床200-250rpm孵育0.5-1h。
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. 4000rpm离心10min, 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。
5. 向有酵母块体沉淀的离心管中加入250µl **Solution I** (已加入**RNase A**), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮酵母沉淀, 然后静置5 min。
注意: 如果有未彻底混匀的酵母块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
6. 向离心管中加入250µl **Solution II**, 温和地上下翻转6-8次使酵母块充分裂解。
注意: 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组DNA, 造成提取的质粒中混有基因组DNA片断。此时溶液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过5min, 以免质粒受到破坏。如果未变得清亮, 可能由于酵母体过多, 裂解不彻底, 应减少酵母块体量。
7. 向离心管中加入350µl **Solution III**, 立即温和地上下翻转6-8次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm离心10 min。
注意: **Solution III** 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。
8. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
9. 向吸附柱中加入500µl **DNA Wash Buffer** (使用前请先检查是否已加入相应体积的无水乙醇), 12,000 rpm离心30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
10. 重复操作步骤9。
11. 将吸附柱放入收集管中, 12,000 rpm离心1 min, 将吸附柱中残余的漂洗液去除。
12. 将吸附柱开盖, 置于室温放置3-5 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
13. 将吸附柱置于一个干净的1.5ml离心管中, 向吸附膜的中间部位滴加100-150µl洗脱缓冲液**Elution Buffer** (或者ddH₂O), 室温放置2 min, 12,000 rpm离心2 min将质粒溶液收集到离心管中。
注意: 将洗脱缓冲液**Elution Buffer** (或者ddH₂O) 预热至60°C将有助于提高质粒洗脱的效果。

仅供科学研究, 不得用于临床治疗