

M5 Hiper Yeast Plasmid Mini Kit with Glass Beads

高效酵母质粒小提试剂盒(含玻璃珠)

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper Yeast Plasmid Mini Kit with Glass Beads	50T	MF948-01

【储存条件】

常温运输，室温（15~30°C）保存。

【产品简介】

本试剂盒在普通碱裂解法的基础上进行了改进，玻璃珠可以有效的破除酵母细胞壁，新型硅基质膜和缓冲液系统能高效专一的结合质粒 DNA，同时可以最大限度去除蛋白及其他杂质，整个过程方便快捷，不需使用有毒有害试剂，可以同时处理多个样品。除适用于酵母细胞外，也可用于大肠杆菌。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可用于各种分子生物学实验，如连接、转化、测序和文库筛选等。

【产品组份】

	50T
Buffer P1	15 ml
Buffer P2	15 ml
Buffer N3	20ml
Buffer PS	15ml
Buffer PW (concentrate)	10 ml
Buffer PB	10 ml
Buffer EB	10 ml
Glass Beads	2g
RNase A (10 mg/ml)	150µl
Spin Columns DM	
With Collection Tubes	50

【自备试剂】

β-巯基乙醇、无水乙醇。

【实验准备】

1. 所有组分可在干燥、室温（15-30°C）环境稳定保存 1 年，将吸附柱置于 2-8°C 可保存更长时间，加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8°C 可稳定保存 6 个月。
2. 第一次使用前，将 RNase A 溶液全部加入到 Buffer P1 中，混匀，置于 2-8°C 保存。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer PW 中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查 Buffer P2、Buffer N3 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37°C 水浴几分钟，即可恢复澄清。
5. 注意不要直接接触 Buffer P2 和 Buffer N3，使用后应立即盖紧盖子。
6. 提取的质粒量与酵母菌株、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，通过电泳或分光光度计法都很难检测到。

【操作步骤】

1. 取 1-5 ml 酵母培养物（最多不超过 5×10^7 个酵母细胞，一般对于酿酒酵母 OD600=1.0 时，相当于 $1-2 \times 10^7$ 细胞/ml）加入离心管（自备）中，12,000rpm (~13,400xg) 离心 30 秒，收集菌体沉淀，尽量吸弃上清。
2. 向菌体中加入 250 μ l Buffer P1（请先检查是否已加入 RNase A），重悬沉淀。
3. 在以上混合物中加入 40 mg 的玻璃珠（Glass Beads），涡旋震荡 10 分钟。
4. 向离心管中加入 250 μ l Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 6-8 次，室温放置 5-10 分钟，此时菌液应变得清亮粘稠。

注意：温和混匀，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 片段。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 向离心管中加入 350 μ l Buffer N3，立即温和地上下颠倒混匀 6-8 次，此时出现白色絮状沉淀，12,000 rpm 离心 20 分钟。

注意：Buffer N3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。

6. 柱平衡：向已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中加入 200 μ l Buffer PS，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
7. 将步骤 5 所得上清加入到已装入收集管的吸附柱中，注意不要吸出沉淀。

注意：吸附柱的最大容积为 750 μ l，溶液分 2 次过柱。

8. 12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
9. 向吸附柱加入 150 μ l Buffer PB，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入 750 μ l Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。
11. 将吸附柱重新放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，倒掉废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l Buffer EB，室温放置数分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20 $^{\circ}$ C 保存质粒。

注意：1) 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置数分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或 >10 kb 时，Buffer EB 在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴预热，可以增加提取效率。

3) 通常酵母质粒拷贝数很低，通过电泳或者分光光度计法都很难检测到。提取的质粒如果用于下一步实验，通常建议使用量为：用作 PCR 模板可使用 1-5 μ l 质粒，用于转化大肠杆菌可使用 5-10 μ l 质粒。

4) 转化大肠杆菌时应使用商业化高转化效率的感受态细胞。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。