

## Yeast Plasmid Extraction Micro Kit

### 酵母质粒小量提取试剂盒

本产品适合于从 1~5ml 酵母培养液中提取 1~10 $\mu$ g 的质粒 DNA。实验流程可在 60 分钟内完成，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。本试剂盒采用碱裂解法进行裂解，通过 DNA 柱于高盐条件下特异性结合 DNA 的特点，达到纯化的目的。纯化的质粒可直接用于酶切、PCR、测序、连接、转化和标记等。

#### 产品组份

产品编号	DPY142-01 (10 Preps)	DPY142-02 (50 Preps)	DPY142-03 (250 Preps)
RNase Solution	30 $\mu$ l	150 $\mu$ l	750 $\mu$ l
Buffer SL	6 ml	30 ml	150 ml
Lyticase	400 $\mu$ l	1.8 ml	8.5 ml
Buffer S1	3 ml	15 ml	75 ml
Buffer S2	3 ml	15 ml	75 ml
Buffer S3	5 ml	25 ml	125 ml
Buffer W1P	7 ml	30 ml	150 ml
Buffer W2P	3 ml	15 ml	2 $\times$ 40 ml
Buffer EB	1.5 ml	10 ml	40 ml
DNA Extraction Mini Column II	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

#### 保存条件

本产品除酶制品外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer S2 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20 $^{\circ}$ C，试剂盒使用前，短暂离心 RNase Solution，之后将试剂盒提供的 RNase Solution 全部加入至 Buffer S1 中，并保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

## 注意 事 项

- Buffer S1 使用前先将 RNase Solution 进行短暂离心，之后全部加入，保存于 2-8℃。
- Buffer W2P 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 以下离心步骤均在室温进行（20-25℃）
- Buffer S2 及 Buffer S3 对皮肤有一定腐蚀性，不可直接接触。
- Buffer S2 在低温会有白色沉淀析出，须 37℃水浴让沉淀完全溶解后再使用，否则会造成产量波动。

## 实 验 步 骤

1. 取 1~5ml 菌液至离心管中，13,000 × g 离心 1 分钟，收集菌体。  
反应建议在 2ml 离心管进行，若菌液量多，可通过多次离心弃培养液富集菌体。
2. 加入 470μl Buffer SL，10μl 2-巯基乙醇和 30μl Lyticase 至样品中，涡旋重悬菌体，37℃振荡温育 30~60 分钟进行破壁。
3. 4500 rpm 离心 10 分钟收集酵母原生质体，小心吸弃上清液。
4. 加入 250μl Buffer S1（确保已经加入 RNase Solution），高速涡旋重悬沉淀直至看不到细菌团块。
5. 往重悬液中加入 250μl Buffer S2，颠倒混匀 8~10 次，室温放置 5 分钟。  
该步骤不可采用涡旋代替颠倒，否则导致基因组 DNA 被打断，提取的质粒中带有基因组 DNA 片段。充分裂解后溶液颠倒应明显有粘稠感觉且表现透亮。
6. 加入 350μl Buffer S3，立即颠倒 10~15 次让溶液彻底中和使白色沉淀充分分散。
7. 13,000 × g 离心 10 分钟。
8. 将 DNA Extraction Mini Column II 装在收集管中。用移液枪把上清液转移至柱子中。13,000 × g 离心 60 秒。  
转移过程中尽量避免吸入沉淀造成杂质的引入。

9. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1P 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
10. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600 $\mu$ l Buffer W2P (确保无水乙醇已加入)。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
11. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600 $\mu$ l Buffer W2P (确保无水乙醇已加入)。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
12. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟干燥柱子。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇,乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时,该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于 55 $^{\circ}$ C 干燥 5 分钟后再进行洗脱,避免乙醇残留对酶促反应的影响。

13. 把柱子套在干净的 1.5ml 离心管中。加入 30-50 $\mu$ l Buffer EB 至柱子的膜中央。静置 2 分钟,13,000  $\times$  g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
14. (可选)将离心得到的洗脱液重新加入至柱子膜中央,静置 1 分钟, 13,000  $\times$  g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

洗脱体积较小时,可增加该步骤提高回收效率。

15. 弃去柱子,把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. RNA 污染

- 菌种 RNA 含量较高，加入 Buffer S1 后室温放置 5 分钟充分消化 RNA
- Buffer S1/RNase Solution 放置 2-8℃ 保存勿超半年。

### 2. DNA 产量低

- 菌体应该在 Buffer S1 中充分重悬。
- Buffer W2P 没有加入乙醇稀释。
- 加入 Buffer S3 后应立即颠倒混匀。
- 加入 Buffer S2 裂解后溶液浑浊：菌液量加入较多，减少菌液用量。
- 菌液为低拷贝菌液：可提高菌液用量至 10ml，等比例增加 Buffer S1/S2/S3 的用量进行提取，并且进行 2 次洗脱，洗脱液进行 70℃ 预热，其余提取步骤一致。