

## 酵母质粒小量提取试剂盒

### E.Z.N.A.<sup>®</sup> Yeast Plasmid Mini Kit

货号	D3376-00	D3376-01	D3376-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind <sup>®</sup> DNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	5 个	50 个	200 个
YP I Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
YP II Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
YP III Buffer	5 mL	25 mL	80 mL
SE Buffer	3 mL	30 mL	110 mL
HBC Buffer	4 mL	25 mL	80 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 20 mL
Glass Beads	270 mg	2.7 g	10 g
Lyticase	250 units	2,500 units	4 x 2,500 units
RNase A	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Elution Buffer	5 mL	10 mL	40 mL
User Manual	✓	✓	✓

#### ★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 收到试剂盒后，请把 RNase A、Lyticase 置于 -20°C 作长期保存；
3. RNase A 加入到 YP I Buffer 后请置于 2-8°C 保存；
4. YP II Buffer 在不使用时，请务必拧紧瓶盖，避免长时间暴露于空气中；
5. 当贮存温度较低时，HBC Buffer、YP II Buffer 及 YP III Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中，至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
6. 本试剂盒仅限科学研究。

#### ★ 实验前准备

1. 将整管 RNase A 加入到 YP I Buffer 瓶内，混匀后 2-8°C 保存。

2. 每 1mL SE Buffer 加入 10uL 2-巯基乙醇，室温放置不超过一周。
3. 按照下表加入 SE Buffer 准备浓度为 2500 Units/mL 的 Lyticase Solution。溶解后放置 -20°C 保存，每个样品需要加入 20μL Lyticase Solution。

货号	SE Buffer 加入量
D3376-00	100μL
D3376-01	1 mL
D3376-02	1 mL (每管)

4. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后均置于室温保存。

货号	DNA Wash Buffer 稀释 无水乙醇 加入量	HBC Buffer 稀释 异丙醇 加入量
D3376-00	6 mL	1.6mL
D3376-01	60 mL	10 mL
D3376-02	80 mL (每瓶)	32mL

#### ★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 无水乙醇、异丙醇、2-巯基乙醇
- ✓ 离心速度可达 13,000xg 的离心机
- ✓ 温度可达 30°C 的孵育装置
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 无菌无酶的 1.5 或 2mL 离心管
- ✓ (可选) 3M NaOH

#### ★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 在 10-20mL 培养管中用携带所需质粒的酵母接种于 5mL YDP 培养基，并于 30°C 培养 16-24h；
2. 取 1.0~3.0mL 培养的菌液，室温下 5,000xg 离心 5min 收集酵母；酵母细胞量建议不要超过  $2 \times 10^7$  个。
3. 弃除上清培养基，在离心管中加入 480μL SE Buffer/2-巯基乙醇混合液，加入 20μL Lyticase Solution。高速涡旋 1min，充分重悬打散菌体沉淀有利于获得理想产量；

**# 注意：**使用前必须将 2-巯基乙醇加入 SE Buffer 中，该混合液可以在室温下放置一周。

4. 30°C 孵育至少 30min;
5. 室温下 4,000xg 离心 5min，弃上清;
6. 加入 250  $\mu$ L YP I Buffer/RNaseA 混合液，加 50mg Glass Beads，高速涡旋 5min 使细菌完全分散;

**# 注意：**YP I Buffer 使用前必须加入 RNase A。

7. 室温静置让管中 Glass Beads 沉于管底，转移菌体悬浮液到一新的 1.5mL 离心管中;
8. 往重悬液中加入 250 $\mu$ L YP II Buffer，轻轻颠倒数次混匀，如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min;

**# 注意：**避免剧烈混合裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂（当使用完 YP II Buffer 以后，须盖紧瓶盖保存）。

9. 加入 350 $\mu$ L YP III Buffer，温和颠倒数次至形成白色絮状沉淀。室温下， $\geq$  10,000xg 离心 10min;
10. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套至 2ml 离心管中;

#### **# 可选柱平衡处理：**

- 1) 往空 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 内加入 100 $\mu$ L 3M NaOH;
- 2) 室温下 13,000xg 离心 30-60s，弃除滤液。

11. 转移不超过 700 $\mu$ L 上清液至 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column，室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液;
12. 重复步骤 11，直至步骤 9 所有上清液都完全通过柱子;
13. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管，加入 500 $\mu$ L HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释），室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液;

**# 注意：**HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。

14. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管，加入 700 $\mu$ L DNA Wash Buffer，室温下最大速度离心 1 min，弃除滤液;

**# 注意：**DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

# **可选**: 弃去滤液, 重复第 14 步进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;

15. 弃去滤液, 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质;

16. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上, 加入 50-100 $\mu$ L Elution Buffer 到结合柱基质中, 静置 1min, 13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA;

# **注意**: 首次洗脱可获得 65-80%的质粒 DNA, 可按照实际需求进行二次洗脱。

- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱 (可增加产量, 但会导致浓度降低)
- 将第一次洗脱出的 Elution Buffer 重新加回到柱子中进行二次洗脱 (可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积)

17. 将洗脱的 DNA 保存在-20°C。

### ★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

这个方案采用真空抽滤方案来提取质粒, 使用真空抽滤可大大减少离心时间, 减少重复倒弃滤液和加液的过程。使用前请仔细阅读离心方案, 并按离心方案的步骤 1-9 进行细菌的收集, 重悬, 裂解, 中和以及离心去除杂质, 以获得澄清的上清液。

1. 按照离心方案的 1-9 步, 准备好澄清的细菌裂解液;

2. 按英文使用说明准备好真空抽滤器, 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 连接到抽滤器;

3. 转移裂解液到 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column, 小心不要超过结合柱的容积 (700  $\mu$ L), 用真空抽滤让裂解液通过结合柱, 转移剩下的裂解液到结合柱, 抽滤, 直到所有的裂解液都通过结合柱;

4. 加 500 $\mu$ L HBC Buffer (已加异丙醇稀释) 到 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column, 抽滤让液体流过结合柱;

5. 洗涤结合柱: 加 700 $\mu$ L DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释), 抽滤;

# **可选**: 重复步骤 5, 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;

6. 弃去滤液, 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质;

7. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上, 加入 50-100 $\mu$ L Elution Buffer 到结合柱基质中, 静置 1min, 13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA;

# **注意:** 首次洗脱可获得 65-80%的质粒 DNA, 可按照实际需求进行二次洗脱。

- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱 (可增加产量, 但会导致浓度降低)
- 将第一次洗脱出的 Elution Buffer 重新加回到柱子中进行二次洗脱 (可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积)

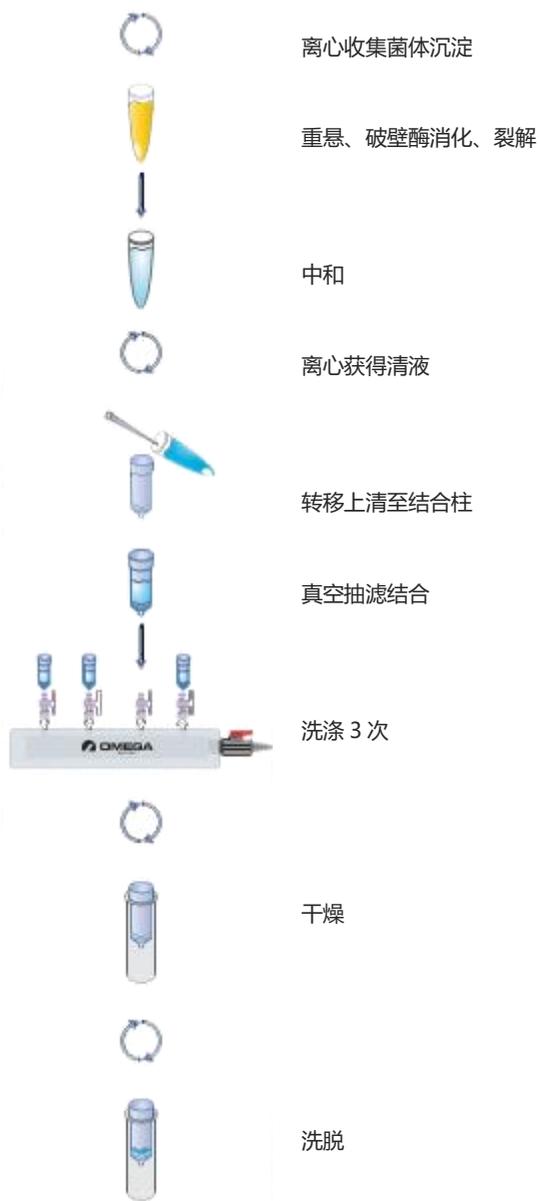
8. 将洗脱的 DNA 保存在-20°C。

## ★ 提取步骤示意图

### 离心操作流程



### 真空抽滤操作流程





## ★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：[omegabiotek.com.cn](http://omegabiotek.com.cn)

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

### 售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。