

D3376 Yeast Plasmid Mini Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书配制和保存以下溶液

- 将一小瓶 RNase A 加入到 YP I 中，保存至 4°C 中
- 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3376-00	8mL
D3376-01	80mL
D3376-02	80mL (每瓶)

- 用 2500units/mL 的 Buffer SE 制备 Lyticase stock solution，并等分成几份。将每个等分试样保存在 -20°C 中，在使用前取出解冻。每个样品需要 20μl 该溶液。

提取步骤：

1. 将携带目的质粒的酵母接种到 10-20mL 含 5mL YPD 培养液的培养管中，30°C，摇菌培养 20-24h；
2. 取 1-3mL 菌液 ($< 2 \times 10^7$ 个细胞)，室温下，4,000xg 离心 5min，弃去培养液，得到细菌沉淀；
3. 加入 480μl Buffer SE，10μl β-巯基乙醇和 20μl lyticase solution，涡旋重悬细菌菌体，细胞沉淀的完全重悬是获得良好产量的关键。在 30°C 孵育至少 30min；
4. 室温下，4,000xg 离心 5min，弃上清；
5. 加入 250μl Buffer YP I/RNase A，50mg glass beads，最大速度涡旋混匀 5min，待 glass beads 沉淀下去后，将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中；
6. 加入 250μl YP II，轻轻颠倒混匀 4-6 次至裂解液变澄清。可在室温下孵育 2min。不可剧烈震荡，否则可能会导致 DNA 断链，降低质粒纯度。（在保存 YP II 时，须将瓶盖盖紧）。
7. 加入 350μl YP III，轻轻颠倒混匀数次直至出现白色絮状沉淀，室温下， $\geq 10,000xg$ 离心 10min；
8. 将 HiBind® DNA mini column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 7 中的上清液至 HiBind® DNA mini column，注意不要转移到沉淀，室温下，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
9. 将 HiBind® DNA mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500μl Buffer HB，10,000xg 离心 1min，弃滤液；
10. 将 HiBind® DNA mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 700μl DNA Wash Buffer，10,000xg 离心 1min，弃滤液，将 HiBind® DNA mini column 套回到 2mL 收集管中；

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

11. 选做: 重复步骤 10, 再次加入 700 μ l DNA wash Buffer 进行二次洗涤;
12. $\geq 13,000xg$ 空柱子离心 2min 干燥柱子基质, 不要跳过此步, 除去乙醇至关重要;
13. 将 HiBind[®] DNA mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ l (将决定最终产物浓度) 无菌去离子水 (或 TE Buffer) 至柱子中, 10,000 xg 离心 1min 洗脱 DNA;
14. DNA 的产量和质量: 适当稀释样品 (20-50 倍), 确定在 260nm 和 280nm 处的吸光度。DNA 浓度计算如下:

$$\text{DNA 浓度} = A_{260} \times 50 \times (\text{稀释倍数}) \mu\text{g/mL}$$

虽然 HiBind[®] DNA mini column 的结合能力为 35 μ g, 但酵母质粒的产量取决于酵母菌株和质粒类型。对于高拷贝数的质粒通常从 5mL 培养菌液中能提到高达 1 μ g 的 DNA。A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值是核酸纯度的指标, 大于 1.8 的值表示 > 90% 的核酸。或者, 与已知浓度的 DNA 样品相比, 有时可通过琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳确定数量 (以及质量)。通常, 洗脱的大部分 DNA 是单体超螺旋形式, 但也可能存在多联体。

真空抽滤方案:

按照“提取步骤”的 1-7 步进行, 后续步骤如下:

Note: 在开始以下操作之前, 请仔细阅读英文说明书。

1. 根据说明书, 将真空抽滤盒与 V-Spin 柱连接好;
2. 将步骤 7 中的上清液转移到 V-Spin 柱中;
3. 打开真空泵, 使样品全部通过柱子, 关闭真空泵;
4. 加入 500 μ l Buffer HB 洗涤, 打开真空泵, 至全部洗涤液通过柱子, 关闭真空泵;
5. 加入 700 μ l DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释) 洗涤, 打开真空泵, 至全部洗涤液通过柱子, 关闭真空泵; 重复加入 700 μ l DNA Wash Buffer 再次洗涤。
6. 将柱子取下套入到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 13,000xg$) 空柱子离心 2min 干燥柱子;
7. 将柱子套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ l TE Buffer 或水, 静置 1-2min, 离心 1min 洗脱 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准