

目 录

简 介	2
原 理	2
组 成	3
保 质 期	4
准 备 工 作	4
方 案 1:HiPure Yeast Plasmid Mini Kit 离 心 方 案	5
方 案 2:HiPure Yeast Plasmid Midi Kit 离 心 方 案	7
常 见 问 题 回 答	9

版本: 2013-10

简介

HiPure Yeast Plasmid Kits 为酵母质粒制备提供了一种简单且经济的方法。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可在 60 分钟完成抽提工作，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。HiPure Yeast Plasmid Mini Kit 适合于从 1-5ml 酵母培养液中纯化高达 1~10 μ g 质粒 DNA。HiPure Yeast Plasmid Midi Kit 适合于从 10-50ml 酵母培养液中纯化高达 10~50 μ g 质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR、标记等下游实验。

产品名称	Yeast Plasmid Mini Kit	Yeast Plasmid Midi Kit
产品编号	P1131	P1132
菌液用量	1-5 ml	10-50 ml
柱子结合能力	20 μ g	100 μ g
使用的离心机	小型离心机	中型离心机
洗脱体积	15~30 μ l	200-300 μ l

原理

HiPure 酵母提取试剂盒系列是先用碱裂解法处理得到上清液后，再用硅胶柱进一步纯化而得到高纯度的质粒 DNA。HiPure 酵母质粒提取试剂盒的原理及流程主要包括：

- **酶法破壁**

酵母经离心收集后，加入破壁酶消化去除细胞壁，离心原生质体。

- **碱裂解法处理**

离心收集细菌，然后加入缓冲液中重悬，碱溶液裂解，加入带有高盐结合条件的中和液进行中和，然后通过离心或过滤去除沉淀，得到的上清液可直接用于上柱。

- **硅胶柱吸附纯化**

硅胶柱在高盐条件下，可吸附核酸，而蛋白质等其它杂质不会被吸附而去除。因中和液中已加入高盐结合条件，因而得到的上清液可直接上柱，经离心过滤就可进行纯化。

- **洗涤除杂和洗脱出核酸**

硅胶柱吸附质粒后，柱子的膜上仍可能带有微量的蛋白质或其它杂质，可通过高盐溶液进行洗涤去除；盐分则可通过含乙醇的洗液洗涤脱盐；最后再用 Tris 缓冲液或灭菌水洗脱出 DNA。

组成

HiPure Yeast Plasmid Mini Kit

Cat.No.	P1131-01	P1131-02	P1131-03
Package	10 次	50 次	250 次
RNase A *	1mg	5mg	10mg
Lyticase Mixture	预加	1.2ml	4 x 1.2 ml
Buffer SE	6 ml	30 ml	110 ml
Glass Beads(0.4~0.6mm)	3 g	12 g	60 g
Buffer P1	3 ml	20 ml	90 ml
Buffer P2	3 ml	20 ml	90 ml
Buffer P3	5 ml	30 ml	110 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

HiPure Yeast Plasmid Midi Kit

Cat.No.	P1132-01	P1132-02	P1132-03
Package	2 次	10 次	50 次
RNase A *	1mg	5mg	10mg
Glass beads(0.4~0.6mm)	2 g	8 g	40 g
Buffer P1	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer P2	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer P3	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer PW1	5 ml	20 ml	60 ml
Buffer PW2*	4 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	10 ml	30 ml
HiPure DNA Midi Column I	2	10	50
15 ml Collection Tube	2	10	50

保质期

HiPure 酵母质粒提取试剂盒，除 RNase A, Lyticase Mixture 外，可在室温下（15-25℃）干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。RNase A 和 Lyticase 干粉采用室温运输，收到产品把 RNase A 和 Lyticase 干粉放置 2-8℃ 保存。低温下，溶液可能会有沉淀形成，需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解后使用。当 RNase A 加到 Buffer P1 后，该混合液可在 2-8℃ 保存 6 个月。RNase A 母液可于 2-8℃ 放置 2 年。

准备工作

- 制备 Buffer P1/RNase A 混合液。短暂离心 RNASE 酶管，把所有的 RNase A 溶液转移至 Buffer P1 中，然后放置于 2-8℃ 保存。
- 无水乙醇
- (可选) 灭菌水
- 培养液和相应的培养管
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，稀释后于室温保存。

1. HiPure Yeast Plasmid Mini Kit 离心方案 (P1131)

该方案采用离心方法，适合于从 1~5ml 酵母培养液中提取 1~10 μ g 高纯度的酵母质粒 DNA。以下离心条件都必须在室温下进行操作。

1. 将带目的质粒的酵母接种于含有 1~5ml 合适的培养液中，30 $^{\circ}$ C 摇床培养 16-24 小时以扩增质粒。
2. 5,000 \times g 离心 5 分钟，收集 1~5ml 菌体（酵母数量不要超过 5×10^8 ）；倒弃培养基，并反扣于吸水纸上吸尽残液。
3. **加入 480 μ l Buffer SE，10 μ l 2-巯基乙醇和 20 μ l Lyticase Mixture 至酵母细胞中。**涡旋重悬酵母细胞，37 $^{\circ}$ C 振荡水浴 30~60 分钟。
使用前，用 Buffer SE 溶解 Lyticase Mixture。有部分物质不能充分溶解，不会影响应用。
4. 5,000 \times 离心 5 分钟收集酵母原生质体，吸弃消化液。
5. **加入 250 μ l Buffer P1/RNase A 混和液，再加入~200mg Glass Beads 至样品中，涡旋 5~10min 去除裂解酵母。**
使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer P1 中。
6. **加入 250 μ l Buffer P2，颠倒混匀 6~8 次。**室温放置 4 分钟。
轻轻颠倒混匀，不能涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。
7. **加入 350 μ l Buffer P3，温和地颠倒数次，至白色絮状沉淀不再增加。**
加入 Buffer P3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。混匀过程必须轻柔而充分。中和后溶液变得浑浊。
8. $\geq 12,000 \times$ g 离心 10 分钟。
9. **将 HiPure Mini Column I 装在收集管中。转移上清液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 500 μ l Buffer PW1 至柱子中，放置 2 分钟。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 500 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签或说明书示。若低温保存，

请恢复至室温后使用。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 500 μ l Buffer PW2 至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**12,000 \times g 离心 2 分钟。**
不要忽略此步。这一步为了去除残留在柱子的乙醇。残留的乙醇去影响下游的实验。
14. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。**加入 15~30 μ l Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。**静置 2 分钟， 12,000 \times g 离心 1 分钟以洗脱 DNA。
15. 丢去柱子，把质粒保存于-20 度。
由于酵母质粒拷贝数很低，该方案得到的质粒产量一般都小于或等于 1 μ g。若是用于 PCR 扩增，推荐使用 0.5-2 μ l 作为模板。若用于大肠杆菌(E.Coli)转化，推荐使用 2-5 μ l 洗脱液，最终可获得 20-30 个克隆菌落。

2. HiPure Yeast Plasmid Midi Kit 离心方案 (P1132)

该方案采用离心方法，适合于从 50ml 酵母培养液中提取 5-50 μ g 高纯度的酵母质粒 DNA。以下离心条件都必须在室温下进行。

1. 将带目的质粒的酵母接种于含有 10-50ml 合适的培养液中，30 $^{\circ}$ C 摇床培养 16-24 小时以扩增质粒。
2. 3,000-5,000 \times g 离心 10 分钟，收集 10-50ml 菌体；倒弃培养基，并反扣于吸水纸上吸尽残液。
3. **加入 1.2ml Buffer P1/RNase A 和 0.6g 玻璃珠至酵母细胞中。**
4. 在涡旋仪上，最高速度涡旋 5~10 分钟。静置 1min 让玻璃珠沉淀，转移上清液至耐高速的离心管中。
5. **加入 1.2ml Buffer P2**，轻轻颠倒混匀 6~8 次。室温放置 4 分钟。
6. **加入 1.7ml Buffer P3**，温和地颠倒数次，至白色絮状沉淀不再增加。
7. 12,000 \times g 离心 10 分钟。
8. **将 HiPure DNA Midi Column I 装在 15ml 离心管中。转移全部上清液至柱子中。** 3,000 \times g 离心 2 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管。**加入 1ml Buffer PW1 至柱子中。** 3,000 \times g 离心 2 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管。**加入 3ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。** 3,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。4,000 \times g 离心 10 分钟。
12. 把柱子套在 15ml 离心管中。**加入 0.25ml Elution Buffer 至柱子的膜中央。** 静置 2 分钟，4,000 \times g 离心 2 分钟。丢去柱子，把质粒保存于-20 度。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
产量低或无产量	
质粒拷贝数低；	提高菌液用量，按低拷贝数方案进行操作
Buffer P2 有沉淀或失效	因 Buffer P2 含有 SDS，在低温时可能会有沉淀析出，使用前需水浴使用溶解；因 Buffer P2 还含有碱，有可能会被空气中 CO ₂ 中和而失败。如 Buffer P2 失效，可重新配制。(0.2 M NaOH, 1% SDS)
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer PW2 中，以防止微生物的污染；
洗脱问题	洗脱核酸最好使用 Elution Buffer (10mM Tris, pH8.5)，灭菌水因 pH 较低，显酸性，而导致洗脱效率下降。洗脱液必须加到柱子的膜的中央；
基因组 DNA 污染	
Buffer P2 裂解出现问题	加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；
RNA 污染	
Buffer P1 不含 RNase A	使用前，没有把 RNase A 加到 Buffer P1 中。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer PW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	质粒洗脱前确保严格按照说明书中的步骤操作干燥，如仍然有乙醇残留，可在洗脱前将柱子在 55℃ 烘箱，干燥 3-10 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。