

## 96 孔酵母质粒小提试剂盒（用于 PCR 及大肠杆菌转化）使用说明书

产品编号：PE053

保存温度：-20°C 保存，开封后根据单品储存条件储存，有效期两年。

产品内容：

Components	PE053-2P	储存温度
96 孔培养板（含 SD-leu 培养基）	2 板	4°C
<b>酶解液</b>	20 mL×2	-20°C
提取液	60 mL×2	4°C
洗涤液	60 mL×2	RT
洗脱液	10 mL	RT
96 孔质粒纯化板	2 板	RT
96 孔质粒回收板	2 板	RT
说明书	1 份	

产品说明：

1: 酵母杂交筛选库后，需要对筛选平板的菌落进行鉴定，由于酵母菌细胞壁以及拷贝数的影响，常规的菌 P 方法成功率不稳定。

2: 本产品是在酵母质粒提取 PE051, PE052 以及阳性克隆检测试剂盒 SK2420 的基础上，致力于解决酵母 PCR 成功率的问题，成功率可达 100%，并免去玻璃珠震荡带来的人力损耗，一次可以处理 192 个样品，避免了摸索 PCR 条件带来的困扰。

3: 一次提取实验，约耗时 90-120min，可以得到 192 个样品的质粒 DNA。所得产物可以满足 PCR 以及大肠杆菌转化实验。

4: 本产品提供的酵母培养基为亮氨酸缺陷培养基，适用于 pGADT7 以及 pGADT7-REC 等 leu 筛选标记的质粒菌的扩繁。

实验准备：

1: 产品储存: 收到产品后, 将 96 孔培养板 (含 SD-leu 培养基) 和提取液置于 4°C 冰箱; 将酶解液置于 -20°C 冰箱; 其他成分置于室温保存。

2: 酵母菌扩繁: 将 96 孔培养板 (含 SD-leu 培养基) 置于超净台中, 将平板菌落分别接种于 96 孔中。盖好硅胶盖。于 28-30°C 培养至培养基变浑浊 (OD 值大于 0.5, 约需要培养 12-24 小时)。

#### 提取步骤一 (酶解):

1. 将酶解液置于 37°C 溶解 (未用完的酶解液可以置于 4°C 保存一周, 或者 -20°C 长期保存)。
2. 离心沉淀 96 孔培养板培养所得酵母细胞 (根据离心机转调整离心时间至酵母菌完全沉淀)。
3. 在 96 孔培养板每孔加入 200 $\mu$ L 的酶解液重悬酵母菌沉淀, 于 37°C 摇床 (200-250rpm/min) 孵育 60min。

注意: 30min 时观察一下酵母菌是否沉淀, 如沉淀震荡重悬。酶解时间可以延长 (2-16h), 不影响提取结果。

#### 提取步骤二 (裂解):

1. 将提取液置于 65°C 水浴预热备用。
2. 酶解完成后, 每孔酶解产物中加入 600 $\mu$ L 的提取液 (此时酶解产物会变澄清, 总体积为 800 $\mu$ L)。

#### 提取步骤三 (纯化):

1. 准备 96 孔质粒纯化板, 置于 96 孔质粒回收板上 (暂放, 后续回收板用于质粒回收用)。
2. 将裂解产物 (每孔 800 $\mu$ L) 加入吸附柱中, 将 96 孔质粒纯化板转移到用过的 96 孔培养板上 (用于废液回收), 室温静置 2min。
3. 将 96 孔质粒纯化板 (套于 96 孔培养板中) 用最高转速离心 (例如 4000rpm/min 离心 5min), 弃穿透液。
4. 将 96 孔质粒纯化板 (套于 96 孔培养板中) 每孔加入 600 $\mu$ L 洗涤液用最高转速离心 (例如 4000rpm/min 离心 5min), 弃穿透液。
5. 将 96 孔质粒纯化板 (套于 96 孔培养板中) 用最高转速离心 (例如 4000rpm/min 离心 5min), 甩干残留液体。

#### 提取步骤四 (收集):

1. 此时将洗脱液置于 65-85°C 水浴预热。
2. 将 96 孔质粒纯化板套于 96 孔质粒回收板上, 每孔加入 50 $\mu$ L 的预热的洗脱液, 室温静置 3min。
3. 将 96 孔质粒纯化板 (套于 96 孔质粒回收板中) 用最高转速离心 (例如 4000rpm/min 离心 5min)。
4. 穿透液即为所得酵母质粒, 取 5 $\mu$ L 用于 50 $\mu$ L 体系的 PCR 反应。取 5-10 $\mu$ L 用于大肠杆菌转化。