



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒
  - ◆ 目录号 **PL06**
  - ◆ 使用手册
  - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

---

## 酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒

目录号: **PL06**

目录编号	包装单位
<b>PL 0601</b>	<b>50次</b>

❖ **适用范围:**

适用于酵母小规模质粒制备 (mini preparations)

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次
<b>RNaseA (10mg/ml)</b>	<b>-20℃</b>	<b>150µl</b>
<b>Lyticase</b>	<b>-20℃</b>	<b>2500U</b>
<b>溶液 YP1</b>	<b>4℃</b>	<b>15 ml</b>
<b>溶液 YP2</b>	<b>室温</b>	<b>15 ml</b>
<b>溶液 YP3</b>	<b>室温</b>	<b>20 ml</b>
<b>去蛋白液 PD</b>	<b>室温</b>	<b>25 ml</b>
<b>漂洗液 WB</b>	<b>室温</b>	<b>15 ml</b> 第一次使用前按说明加指定量乙醇
<b>洗脱缓冲液 EB</b>	<b>室温</b>	<b>15 ml</b>
<b>吸附柱 AC</b>	<b>室温</b>	<b>50 个</b>
<b>收集管 (2ml)</b>	<b>室温</b>	<b>50 个</b>

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

---

储存事项:

1. 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 **RNase A** 加入溶液 **YP1** (终浓度 **100 $\mu$ g/ml**) 置于 **4 $^{\circ}$ C** 保存。如果溶液 **YP1** 中 **RNase A** 失活, 提取的质粒可能会有微量 **RNA** 残留, 在溶液 **YP1** 中补加 **RNase A** 即可。
2. 环境温度低时溶液 **YP2** 中 **SDS** 可能会析出浑浊或者沉淀, 可在 **37 $^{\circ}$ C** 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。
3. 为避免降低活性, 方便运输, 提供 **Lyticase(2500U)** 为冻干粉状, 收到后, 可短暂离心后, 加入 **0.25 毫升灭菌水溶解配制成 10U/ $\mu$ l**, 因为反复冻融可能会降低酶活性, 因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存, **-20 $^{\circ}$ C** 保存。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、**pH** 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒采用改进 **SDS-碱裂解法** 裂解细胞并结合 **lyticase** 特异消化酵母细胞壁, 能在 1 小时内从酵母培养液中分离出高纯度质粒 **DNA**。酵母收集后, 加入破壁酶去除细胞壁后, 然后碱裂法裂解细胞, 离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 **PH** 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 **DNA**, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 **PH** 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 **DNA** 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 快速、方便, 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好, 可以直接用于酶切、转化、**PCR**、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

---

❖ **注意事项**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 溶液YP3和去蛋白液PD中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服**。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
3. **通常酵母质粒拷贝数都很低**，高拷贝质粒最大得率一般为每5 ml 培养物提取1μg左右的质粒。用于下游试验时通常建议使用量为：**1-5μl用做PCR 模板;5-10μl 用于转化大肠杆菌,选择高效率的感受态细胞**。
4. 得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50μg/ml DNA。电泳可能为单一条带，也可能为2条或者多条**DNA条带**，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%**。
5. 用户需要自备 **Sorbitol buffer( 1M 山梨醇， 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA， 14 mM β -巯基乙醇)**。**配制方法**：在 600 ml 去离子水里面溶解 182.2 克山梨醇，加入 200 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4℃ 保存。临用前加 0.1% β -巯基乙醇(商品化的 β -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
6. 菌体浓度检测一般OD<sub>600</sub>值为1的时候，酿酒酵母细胞是1-2x10<sup>7</sup> cells/ml，由于菌种和分光光度计不同即使同样细胞数量OD值变化也很大，以上仅供参考。
7. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱**，但应该确保批**pH大于7.5**，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在-20℃。质粒DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

---

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

**提示：**

- ⇒ 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 YP1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。
- ⇒ 将 YP3 溶液放在冰上预冷。
- ⇒ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.1% β - 巯基乙醇，回复到室温备用。

1. 取 1.5-5 毫升酵母培养物(不超过  $5 \times 10^7$  cells)，9,000rpm 离心 30 秒，**尽可能的吸弃上清**，收集菌体。

**收集超过 1.5 毫升菌液**，可以离心弃上清后，在同一个 **1.5ml** 管内加入更多的菌液，**重复步骤 1**，直到收集到足够的菌体。

2. 加入 600μl Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；可按照 20-50U/1x10<sup>7</sup>cells 的比例加入 Lyticase(一般 5 ml 培养物可能需要加到 200U)，充分颠倒混匀，37℃ 温育至少 30 分钟消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。

**如果破壁效果不好导致质粒产量低**，可以加大 **lyicase** 用量来提高酶工作浓度，还可以延长消化时间来提高效果，不适合 **Lyticase** 消化的酵母可选用 **Zymolase** 或者其它方法如玻璃珠涡旋，反复冻融等。

3. 13,000rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清，加入 250μl 溶液 YP1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。

**如果有未彻底混匀的菌块**，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

4. 加 250μl 的溶液 YP2，温和地上下翻转 4 -7 次使菌体充分裂解，室温放置 4 分钟。**温和地混合**，不要剧烈震荡，以免基因组 **DNA** 剪切断裂！所用时间不应超过 **5 分钟**！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘

---

稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。

5. 加 350 $\mu$ l 溶液 YP3，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。冰上静置 3-5 分钟，13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。

加入溶液 YP3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. 将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。

7. 可选步骤:加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PD，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃废液。

此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 *endA* 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5 $\alpha$  等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。

9. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。

10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，13,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 $\mu$ l，体积小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

---

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
质粒 DNA 产量低	* 忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长- <b>建议</b> ：确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素。
	* 细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解- <b>建议</b> ：接种过夜培养的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中，培养 12-16 个小时。
	* 使用了低拷贝数质粒- <b>建议</b> ：使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积。
	* 细菌培养时间过短，细菌浓度过低- <b>建议</b> ：细菌培养到 $[A_{600}]$ 吸光值为 2 -4 时，收集菌体。
	* 细菌细胞裂解不完全- <b>建议</b> ：使用建议的菌体处理量，不要过量；涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 YP1 中，不应该见到未散开的细菌团块；加入裂解液 YP2 后，应该是粘稠和透明的。
	* 某些种类酵母裂解困难- <b>建议</b> ：仔细阅读步骤 2，确认处理的酵母种类可以用 lyticase 裂解，还可以考虑选用其它裂解方法如 Zymolase、玻璃珠涡旋、反复冻融等，lyticase 最好按照使用量分装冻存，保证有效性
未提取到 质粒 DNA	* 质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确- <b>建议</b> ：分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量。
	* 洗脱效率不高- <b>建议</b> ：请阅读实验步骤 10 和注意事项 7。
	* 漂洗液 WB 中忘加无水乙醇- <b>建议</b> ：第一次实验时，在漂洗液 <b>WB</b> 中加入指定量无水乙醇
	* 质粒洗脱液含有较多乙醇，琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔- <b>建议</b> ：确保已经做了步骤 10，将离心吸附柱的残留乙醇去除；或者适当提高上样缓冲液浓度。。



问题	评论与建议
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 10, 乙醇抑制了酶切反应- <b>建议</b> : 做步骤 10, 之后在空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。 *一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应- <b>建议</b> : 将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心 1 分钟, 小心取上清使用。
质粒 DNA 降解或者无质粒 DNA	*核酸酶活性太高- <b>建议</b> : 确保已经做了步骤 7, 使用去蛋白液 PD 去除核酸酶。
基因组 DNA 污染	*裂解时基因组 DNA 被剪切打断了- <b>建议</b> : 做步骤 4 时, 轻柔颠倒混匀, <b>不要涡旋或者剧烈震荡</b> 。
质粒 DNA 缺口或者电泳时超螺旋带前出现变性质粒带	*步骤 4 裂解时间过长- <b>建议</b> : <b>裂解时间不要超过 5 分钟</b> 。
产物中含有 RNA 污染	*第一次做实验时, 忘记将 RNase A 加入 YP1 溶液, RNase A 失活或者起始处理量过量- <b>建议</b> : 第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 YP1; YP1 溶液超过 3 个月的, 可加入一些新 RNase A; 处理量不要过量; 菌体重悬于 YP1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分作用后再进行下一步。

