

版本号:211201

Yeast Plasmid Maxi Kit**酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒**

目录号: PL19

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10次(PL1901)
RNase A (10mg/ml)	-20℃	750µl
破壁酶	4℃	1g (常温运输)
溶液 YP1	4℃	75 ml
溶液 YP2	室温	75 ml
溶液 YP3	室温	100 ml
去蛋白液 PE	室温	63 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	50 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 DC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25℃ 室温至少保存 6 个月, 4℃ 保存 12 个月, 长期保存放 -20℃。
2. 第一次使用时, 将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 YP1 后(终浓度 100µg/ml) 置于 4℃ 保存。如果溶液 YP1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留, 在溶液 YP1 中补加 RNase A 即可。
3. 环境温度低时溶液 YP2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀, 可在 37℃ 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。

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破壁酶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艾德莱特制吸附膜，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. 不快速、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. 所有的离心步骤未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到至少12,000 x g，带50ml转头的台式离心机。
2. 溶液YP3和去蛋白液PE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。OD₂₆₀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。本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 Na₂EDTA， 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

Na₂EDTA (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OD₆₀₀值为1的时候, 酿酒酵母细胞是1-2x10⁷ 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漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇, 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。
- ⇒ 将溶液 YP3 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. 取约 100-180 毫升酵母培养物, 12,000 x g, 离心 1 分钟, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。

收集超过 50 毫升菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 50ml 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 10ml Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞; 加入 0.1g 破壁酶 (破壁酶临用前用 2ml Sorbitol buffer 溶解), 充分颠倒混匀, 37℃ 温育 1-2 小时消化细胞壁, 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过低, 可以加大破壁酶用量来提高酶工作浓度, 还可以延长消化时间或者提高温度到 45℃ 来提高效果, 不适合破壁消化的酵母可选用 Lyticase 或者 Zymolase 或者其它方法如加玻璃珠涡旋振荡, 反复冻融等。

3. 12,000 x g, 离心 2 分钟, 尽可能吸弃上清, 加入 7ml 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 7ml 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。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 加 10ml 溶液 YP3，立即温和地上下翻转 4 -7 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。12,000 x g 离心 10-15 分钟，小心取上清，避免吸收到漂浮的白色沉淀。

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

6. 可选，一般不需要：4℃，12,000 x g 离心 10-15 分钟，小心取上清。
7. 将上一步所得上清加入吸附柱 DC 中（每次不超过 10 ml，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml，以防产生漏液现象），12,000 x g 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

如果上清体积超过 20ml，可以分多次过柱。

8. 加入 10ml 去蛋白液 PE(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 x g 离心 1 分钟，弃掉废液。
9. 加入 10ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 x g 离心 1 分钟，弃掉废液。
10. 重复操作步骤 9 一次。
11. 将吸附柱 DC 放回空收集管中，最高速（最好大于 12,000 x g）离心 3 分钟以干燥基质膜上残留乙醇。打开盖子室温晾干 2-3 分钟。

该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

12. 取出吸附柱 DC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中预热可提高产量），室温放置 2 分钟，12,000 x g 离心 1-2 分钟。

推荐：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 分钟，12,000 x g 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

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 0.6ml，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。