

版本号:240421

## Yeast HighPure Plasmid Mini Kit 酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL06

### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL0601)	100 次 (PL0602)	100 次 (PL0603)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	150 µl	250 µl	500 µl
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml	5 ml	10 ml
溶液 YP1	4°C	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 YP2	室温	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 YP3	室温	20 ml	35 ml	70 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	64 ml
		第一次使用前按标签说明加指定量乙醇		
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按标签说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	15 ml	20 ml
吸附柱 EC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 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°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 -20°C。
2. **第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 YP1 后置于 4°C 可保存 3 个月左右。**如果溶液 YP1 中 RNase A 时间较久失活了, 提取的质粒可能有微量 RNA 残留, 在溶液 YP1 中补加 RNase A 即可。
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出, 出现浑浊或者沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟即可恢复澄清, 重新混匀, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。

4. Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液，因此比较粘稠，请小心取用， $-20^{\circ}\text{C}$  保存。蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的混合酶，它含有纤维素酶，果胶酶，淀粉酶，蛋白酶等 20 多种酶。适合破碎溶解各种酵母的细胞壁。

#### ❖ 产品介绍：

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞并结合 Lytic Enzyme 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。

#### ❖ 注意事项

1. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 12,000 rpm 的台式离心机。
2. 通常酵母质粒拷贝数都很低，一般通过电泳或者分光光度计都很难检测到。提取的质粒如果用于下游试验时通常建议使用量为：1-5  $\mu\text{l}$  用做 PCR 模板；5-10  $\mu\text{l}$  用于转化大肠杆菌，选择商业化的高效率的感受态细胞。
3. 用户需要自备 Sorbitol buffer( 1M 山梨醇， 0.1M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ， 28 mM  $\beta$ -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  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L， $4^{\circ}\text{C}$  保存。临用前加 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇(商品化的 $\beta$ -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
4. 菌体浓度检测一般 OD 600 值为 1 的时候，酿酒酵母细胞是  $1-2 \times 10^7$  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。
5. 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 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  $-20^{\circ}\text{C}$ 。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10 mM Tris-HCl, 1 mM 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）

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中按标签指示加入无水乙醇，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 P1 中，混匀。每次使用后置于 2-8°C 保存。
- ⇒ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.2% β-巯基乙醇，回复到室温备用。

1. **柱平衡：**向吸附柱 EC 中加入 100 μl 平衡液，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

▲ 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

2. 取 1.5-5 ml 过夜培养的酵母培养物(不超过  $1-2 \times 10^7$  cells/ ml)加入 1.5 ml 离心管，12,000 rpm 离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。

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

3. 加入 300 μl Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；再加入 50 μl Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37°C 温育 1-3 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低，可以加大 Lytic Enzyme 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°C 来提高效果，不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。玻璃珠法：向菌体中加入 250 μl 溶液 YP1(请先检查是否已加入 RNase A)重悬沉淀，彻底悬浮菌体，加入 0.1g 直径为 0.45-0.55 mm 的酸洗玻璃珠，涡旋振荡 10 min，静置几分钟让玻璃珠沉淀，小心吸取上清到一个新管后接后续步骤 4。

4. 12,000 rpm 离心 1 min，尽可能吸弃上清。加 250 μl 溶液 YP1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者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。

5. 加 250 μl 的溶液 YP2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min。

▲ 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 min！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

6. 加 350 μl 溶液 YP3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 min，小心吸取上清加入吸附柱 EC 中（吸

附柱放入收集管中)，避免吸收到漂浮的白色沉淀。

▲ 加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

7. 12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
8. 加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 PE (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
9. 加入 600  $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。再加入 600  $\mu$ l 漂洗液 WB 重复漂洗一次，弃滤液。
10. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，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，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 50  $\mu$ l-100  $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 80°C-90°C 水浴中预热可提高产量)，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，弃吸附柱。

▲ 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 min，12,000 rpm 离心 1 min。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，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 30  $\mu$ l）。