

版本号:240422

## Yeast HighPure 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)	4°C	750 µl
破壁酶	4°C	1 g
溶液 YP1	4°C	70 ml
溶液 YP2	室温	70 ml
溶液 YP3	室温	100 ml
去蛋白液 PE	室温	64 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°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 (终浓度 100 µg/ml) 置于 4°C 可保存 3 个月左右。**如果溶液 YP1 中 RNase A 时间较长失活了, 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 YP2 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。

## ❖ 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，能快速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. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速，方便。
3. 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. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到8,000 ×g (约9,000 rpm)，带50 ml转头的台式离心机。
2. 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1 μg左右的质粒。用于下游试验时通常建议使用量为：**1-5 μl** 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。
3. 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°C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14 M)。
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50 μg/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. 菌体浓度检测一般OD 600值为1的时候，酿酒酵母细胞是1-2×10<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。

6. 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°C。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）

- ⇒ 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 0.1% β-巯基乙醇，回复到室温备用。

1. 取 120-200 ml 酵母培养的菌液加入 50 ml 离心管，8,000 ×g（约 9,000 rpm），离心 1 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。
  - ▲ 如使用 50 ml 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 50 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。
2. 加入 10 ml Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；加入 0.1 g 破壁酶（破壁酶临用前用 2 ml Sorbitol buffer 溶解），充分颠倒混匀，37°C 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°C 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. 8,000 ×g 离心 2 min，彻底吸除上清，加 7 ml 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。
4. 加 7 ml 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。

5. 加 10 ml 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。8,000 ×g 离心 10 min，小心吸取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。

▲ 加入溶液 YP3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

▲ 如有漂浮白色沉淀，可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取，偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，后续过滤漂洗过程中都会去除。

6. 将上一步得到的上清中加入吸附柱 DC 中，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。  
▲ 个别情况下离心机转子倾角较大，建议每次加入吸附柱的溶液体积为 9 ml（不超过，以防产生漏液现象）。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

7. 加入 10 ml 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

8. 加入 10 ml 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。再加入 10 ml 漂洗液 WB，重复漂洗一次，弃滤液。

9. 将空吸附柱放回收集管中，8,000 ×g 离心 3 min 以干燥基质膜上残留乙醇。  
▲ 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降低洗脱效率，降低质粒产量。

10. 将吸附柱置于新的 50 ml 离心管中，室温晾干 2-3 min，**在吸附膜的中间部位**加 1 ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-75°C 水浴中预热可提高产量），室温放置 2 min，8,000 ×g 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，8,000 ×g 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 0.6 ml）。