

酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒

KD404 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
平衡液	室温	5ml
RNase A (10mg/ml)	4°C	150μl
Lytic Enzyme	-20°C	2.5ml
Sorbitol buffer	4°C	25ml
巯基还原剂	室温	50μl
溶液 YP1	4°C	15ml
溶液 YP2	室温	15ml
溶液 YP3	室温	20ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前加入 10ml 乙醇
漂洗液 WB	室温	13m 第一次使用前加入 52ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 EC 和收集管 (2ml)	室温	50 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, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 YP1 (终浓度 100μg/ml) 置于 4°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。

3. 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°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
4. Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液, 因此比较粘稠, 请小心取用, -20°C 保存。蜗牛酶是从蜗牛的腺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。
5. 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 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。

关于平衡液的使用

1. 介绍: 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团, 提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液, 若不小心碰到, 请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成, 请加热至 37°C 使沉淀完全消失。
2. 使用方法: 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

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 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。

- 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 μ l 用做 PCR 模板;5-10 μ l 用于转化大肠杆菌,建议选择商业化的高效率的感受态细胞。
- Sorbitol buffer 使用前需加巯基还原剂。 (**每 300 μ l buffer 加入 1 μ l 巯基还原剂**)
- 菌体浓度检测一般 OD600 值为 1 的时候酿酒酵母细胞是 1-2 \times 10⁷ 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。
- 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 $^{\circ}$ 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。

关于平衡液的使用

- 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37 $^{\circ}$ C使沉淀完全消失。
- 使用方法：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。12000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

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 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 $^{\circ}$ C 保存。**
 - ⇒ **吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入巯基还原剂（每 300 μ l buffer 加入 1 μ l 巯基还原剂），室温备用。**
- 取 1.5-5 毫升酵母培养物(不超过 5 \times 10⁷ 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。
 - 加入 300 μ l Sorbitol buffer (已加巯基还原剂)，轻柔吹打充分重悬细胞；再加入 50 μ l Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 来提高效果，

不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。玻璃珠法：向菌体中加入 250 μ l 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 0.45-0.55mm 的酸洗玻璃珠，涡旋振荡 10 分钟，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。

3. 12,000 rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清，加入 250 μ l 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 250 μ l 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 μ 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。12,000 rpm 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。

平衡液预处理吸附柱：平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

6. 将上一步所得上清加入吸附柱 EC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
7. 加入 500 μ 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 秒，弃废液。
8. 加入 600 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。
9. 重复步骤 8 一次
10. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，12,000 rpm 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 EC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-100 μ 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，12,000 rpm 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。
12. 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 μ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。得到的质粒 DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。