



**北京博凌科为生物科技有限公司**

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: [blkwbio@blkwbio.com](mailto:blkwbio@blkwbio.com)

- ◆ 酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒
  - ◆ 目录号 1206
  - ◆ 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: 1206

### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (120601)
平衡液	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150 µl
Lyticase	-20℃	2500U
溶液 YP1	4℃	15 ml
溶液 YP2	室温	15 ml
溶液 YP3	室温	20 ml
去蛋白液 PD	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
吸附柱 AC	室温	50 个
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. 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 µg/ml) 置于 4℃ 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℃ 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/μl**，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℃ 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。

#### ❖ 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℃ 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 100μl 的平衡液至柱子中。13000 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 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，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 $\mu$ l**用做PCR 模板;**5-10 $\mu$ l**用于转化大肠杆菌,选择商业化的高效率的感受态细胞。
4. 用户需要自备 **Sorbitol buffer**(**1M 山梨醇**，**0.1M Na<sub>2</sub>EDTA**，**14 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 Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4 $^{\circ}$ C 保存。临用前加 0.1% $\beta$ -巯基乙醇(商品化的 $\beta$ -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
5. 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1-2 $\times 10^7$  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。
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 $^{\circ}$ 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。

❖ **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 $^{\circ}$ C 保存。
  - ⇒ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.1% $\beta$ -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 600 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 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 lyticase 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 消化的酵母可选用其它方法如玻璃珠涡旋击打, 反复冻融等。**

3. 13,000rpm 离心 1 分钟, 尽可能吸弃上清, 加入 250 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。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。**

#### 平衡液预处理吸附柱:

**使用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 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. 加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PD, 12,000rpm 离心 30-60 秒, 弃废液。
8. 加入 600 $\mu$ 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 600 $\mu$ 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，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。**