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/
E-mail:blkwbio@blkwbio.com

- 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒
- 目录号 **1219**
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外

酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒（离心柱型）

目录号：1219

目录编号	包装单位
121901	**10次**

❖ 适用范围：

适用于大规模高纯度酵母质粒制备

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次
RNaseA（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**	**110 ml**
去蛋白液 PD	**室温**	**100 ml**
漂洗液 WB	**室温**	**25 ml x 2** ***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. **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℃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. **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进口世界著名公司特制吸附膜，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. 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. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，**使用转速可以达到至少6,000xg，带50ml转头的台式离心机。

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，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。OD_{260}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 Na_2EDTA，14 mMβ -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_2EDTA (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OD_{600}值为1的时候,酿酒酵母细胞是$1-2x10^7$cells/ml，由于菌种和分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 P1 中，混匀。每次使用后置于 2-8℃保存。

⇨ 将溶液 P3 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，6000xg，离心 10 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. 6000xg，离心 10 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。冰上静置 5-10 分钟，4℃ ，至少 2500xg 离心 20 分钟(加大离心力可相应缩短离心时间,如 15000xg 离心 10 分钟)，小心取上清，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，如果上清中还有飘浮白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. **可选,一般不需要:**4℃，2500xg 再次离心 10 分钟，小心取上清。

7. 将上一步所得上清加入吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管中）,静置 2 分钟,2500xg 离心 2 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 PD，2500xg 离心 2 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!**），2500xg 离心 2 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 9000xg，如果离心机转速低，需要相应延长离心时间）离心 10 分钟以干燥膜基质残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。

    该步骤目的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。如果洗脱产量低，则必须加做步骤 12。

12. **可选步骤:** 选择以下两种方法之一干燥柱子：

1) 取下柱子放置于真空容器中，密封真空容器，提供真空 15 分钟；

2) 将柱子放置于 60－65℃真空干燥箱或烘箱中，放置 10-15 分钟。

13. 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℃水浴中预热效果更好），室温放置 2 分钟，6000 xg 离心 5 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 2 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 0.6ml，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。