



酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒

Rapid Yeast Plasmid DNA Kit

产品信息:

试剂盒组成	保存	DP104-01
		50 次
RNase A (干粉)	室温	1 支
Lyticase	-20℃	2500U
溶液 YP1	4℃	15ml
溶液 YP2	室温	15ml
溶液 YP3	室温	20ml
去蛋白液 PD	室温	25ml
漂洗液 WB	室温	15ml
		第一次使用前加入 60ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

保存条件: 本产品收到后按照上面指示温度存放各成份, 18 个月不影响使用效果。

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, 然后碱裂法裂解细胞, 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.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 μ g/ml) 置于 4 $^{\circ}$ 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。
- 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 $^{\circ}$ 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。
- 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 **250 μ l 灭菌水溶解配制成 10U/ μ l**, 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 $^{\circ}$ C 保存。
- 4.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。**
- 5.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 μ g/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%。
6. 用户需要自备 **Sorbitol buffer(1M 山梨醇, 0.1M Na₂EDTA, 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 200ml 0.5 M Na₂EDTA (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% β -巯基乙醇(商品化的 β -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
- 7.菌体浓度检测一般 OD₆₀₀ 值为 1 的时候, 酿酒酵母细胞是 1-2 $\times 10^7$ 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。
- 8.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。

自备试剂: 无水乙醇, Sorbitol buffer (1M 山梨醇, 0.1M EDTA, 14mM β -巯基乙醇)

操作步骤:**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 (干粉) 倒入溶液 P1 中并使用 P1 冲洗离心管, 混匀, 每次使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

⇒ 要想得到更高的提取量，可将 YP3 溶液放在冰上预冷。

⇒ 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 1.5ml 酵母培养物(不超过 5×10^7 cells), 12,000rpm 离心 30 sec, 尽可能的吸弃上清, 收集酵母细胞。
2. 加入 600μl Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞, 加入 Lyticase 50U (5μl, 10U/μl), 充分颠倒混匀, 37℃温育至少 30 min 消化细胞壁, 中间可颠倒数次帮助消化。

还可以延长消化时间来提高破壁效果，不适合 Lyticase 消化的酵母可选用 Zymolase 或者其它方法如玻璃珠涡旋，反复冻融等。(如果提取量大于 1.5ml 可单独购买 Lyticase)

3. 12,000rpm 离心 1 min, 尽可能吸弃上清, 加入 250μl 溶液 YP1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮。
4. 加 250μl 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 4min。
5. 加 350μl 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。冰上静置 3-5 min, 12,000rpm 离心 5 min, 小心取上清。
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 sec, 倒掉收集管中的废液。
7. 加入 500μl 去蛋白液 PD, 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃废液。
8. 加入 500μl 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃掉废液。
9. 重复步骤 8。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 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 AC, 放入一个干净的离心管中, 室温放置几分钟。
12. 在吸附膜的中间部位加 50μl-100μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中加热效果更好), 室温放置 2 min, 12,000rpm 离心 1 min。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 min。(注意: 若后续做测序, 需使用 ddH₂O 做洗脱液, 并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。且 DNA 产物应保存在-20℃, 以防 DNA 降解。)

20241119