

Imagene®

Yeast HiPure Plasmid Mini Kit 酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

Yeast HiPure Plasmid Mini Kit

酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PE104

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PE104-01)
平衡液 BS	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150 μl
Lytic Enzyme	-20℃	2.5 ml
溶液 YA	4℃	15 ml
溶液 YB	室温	15 ml
溶液 YC	室温	20 ml
去蛋白液 PS	室温	16ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
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 EC	室温	50 个
收集管 CT (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:

- 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 YA (终浓度 100μg/ml) 置于 4℃ 保存。如果溶液 YA 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 YA 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 YB 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。
- Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液, 因此比较粘稠, 请小心取用, -20℃ 保存。蜗牛酶是从蜗牛的嗦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。

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 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 BS 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 BS 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 BS 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 CT 中，吸取 100μl 的平衡液 BS 至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管 CT 中废液，将吸附柱子重新放回收集管 CT。此时平衡液 BS 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。
2. 溶液 YC 和去蛋白液 PS 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：1-5μl 用做 PCR 模板；5-10μl 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 Na₂EDTA，28 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 Na₂EDTA (pH 8.0)，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4℃ 保存。临用前加 0.2% β-巯基乙醇(商品化的 β-巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。

5. 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。
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 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 YA 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8℃ 保存。
 - ⇒ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.2% β-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 5×10^7 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 300μl Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞; 再加入 50μl Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37℃ 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℃ 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 250μl 溶液 YA(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. 13,000rpm 离心 1 分钟, 尽可能吸弃上清, 加入 250μl 溶液 YA 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 250μl 的溶液 YB, 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 YC，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 YC 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

平衡液 BS 预处理吸附柱：

使用平衡液 BS 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 BS 的使用”

6. 将上一步所得上清加入吸附柱 EC 中（吸附柱 EC 放入收集管 CT 中），12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管 CT 中的废液。
7. 加入 500 μ l 去蛋白液 PS（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30-60 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！），12,000rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。
9. 加入 600 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱 EC 放回空收集管 CT 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 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，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 μ l，体积小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com