武汉楚诚正茂科技工程有限公司
电话（传真）：027-87388389
400 电话：400-6345-876
地址：武汉市华大家园 A04-1-602
网址：http://www.chuchengkj.com

武汉楚诚生物

酵母高纯度质粒小量快速提取试剂盒

目录编号：CC9750

包装单位：50 次

适用范围：适用于酵母小规模质粒制备（mini preparations）

试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次
RNaseA（10mg/ml）	-20℃	150μl
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 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
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 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. 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/ul，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。

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 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 5ml 培养物提取 1ug 左右的质粒。用于下游试验时通常建议使用量为：1-5ul 用做 PCR 模板；5-10ul 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。OD260 值为 1 相当于大约 50 ug/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，14mMβ-巯基乙醇)。配制方法：**在 600ml 去离子水里面溶解 182.2 克山梨醇，加入 200ml 0.5M Na_2EDTA(PH8.0) ，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 OD600 值为 1 的时候，酿酒酵母细胞是 $1-2\times10^7$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，PH8.0），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℃保存。
- ✧ 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 1.5-5 毫升酵母培养物(不超过 5×10^7cells)，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 600ul Sorbitol buffer,轻柔吹打充分重悬细胞;可按照 20-50U/1×10^7cells 的比例加入 Lyticase(一般 5ml 培养物可能需要加到 200U)，充分颠倒混匀，37℃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 lyicase 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 Zymolase 或者其它方法如玻璃珠涡旋，反复冻融等。

3. 13,000rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清，加入 250ul 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 250ul 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 350ul 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 分钟，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。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

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 秒，倒掉收集管中的废液。

7. **可选步骤:**加入 500ul 去蛋白液 PD，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃废液。

此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 加入 700ul 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 500ul 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 100ul 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 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 50ul，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

问题与解决方法

问题	评论与建议
质粒 DNA 产量低	* 忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长-建议：确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素 * 细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解-建议：接种过夜培养的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中，培养 12-16 个小时 * 使用了低拷贝数质粒-建议：使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积 * 细菌培养时间过短，细菌浓度过低-建议：细菌培养到[A600]吸光值为 2-4 时，收集菌体 * 细菌细胞裂解不完全-建议：使用建议的菌体处理量，不要过量；涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 YP1 中，不应该见到未散开的细菌团块；加入裂解液 YP2 后，应该是粘稠和透明的 * 某些种类酵母裂解困难-建议：仔细阅读步骤 2，确认处理的酵母种类可以用 lyticase 裂解，还可以考虑选用其它裂解方法如 Zymolase、玻璃珠涡旋、反复冻融等，lyticase 最好按照使用量分装冻存，保证有效性 * 质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确-建议：分光光度计

	定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量 * 洗脱效率不高-**建议：请阅读实验步骤 10 和注意事项 7**
未提取到质粒 DNA	* 漂洗液 WB 中忘加无水乙醇-**建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇** * 质粒洗脱液含有较多乙醇,琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔-建议：确保已经做了步骤 10，将离心吸附柱的残留乙醇去除；或者适当提高上样缓冲液浓度
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	* 忘记做步骤 10，乙醇抑制了酶切反应-建议：做步骤 10，之后在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发 * 一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心 1 分钟，小心取上清使用
质粒 DNA 降解或者无质粒 DNA	* 核酸酶活性太高-建议：确保已经做了步骤 7，使用去蛋白液 PD 去除核酸酶
基因组 DNA 污染	* 裂解时基因组 DNA 被剪切打断了-建议：做步骤 4 时，轻柔颠倒混匀，**不要涡旋或者剧烈震荡**
质粒 DNA 缺口或者电泳时超螺旋带前出现变性质粒带	* 步骤 4 裂解时间过长-**建议：裂解时间不要超过 5 分钟**
产物中含有 RNA 污染	* 第一次做实验时，忘记将 RNase A 加入 YP1 溶液，RNase A 失活或者起始处理量过量-建议：第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 YP1；YP1 溶液超过 3 个月的，可加入一些新 RNase A；处理量不要过量;菌体重悬于 YP1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分作用后再进行下一步