

M5 HiPer Yeast Plasmid Plus Mini Kit

酵母质粒小提试剂盒（带 Lytic Enzyme）说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Yeast Plasmid Plus Mini Kit	50T	MF120-plus-01

【试剂盒组成、储存、稳定性】：

试剂盒组成	保存	50 次
平衡液	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	150 µl
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml
溶液 YP1	4°C	15 ml
溶液 YP2	室温	15 ml
溶液 YP3	室温	20 ml
去蛋白液 PE	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 (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 YP1（终浓度 100µg/ml）置于 4°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。
- 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°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。
- Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液，因此比较粘稠，请小心取用，-20°C 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。
- 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°C 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PE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°C 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1-2x10⁷ 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°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°C 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 5X10⁷ 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°C 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 YP1(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 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 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 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 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。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 EC 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 500μl 去蛋白液 PE（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 600μl 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 600μl 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 50-100μl 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 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 50μl，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。