

M5 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒 (离心柱型) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒 (离心柱型)	10T	M658-01

【储存条件】

室温储存。

【产品简介】

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。

【产品组份】

试剂盒组成	保存	10T
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

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。

【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 1 μ g 左右的质粒。用于下游试验时通常建议使用量为：1-5 μ l 用做 PCR 模板;5-10 μ l 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 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%。
5. 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 200 ml 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)。
6. 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。
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 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。

【操作步骤】

<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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C, 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。

**【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。