

Version: AD 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Mini Yeast plasmid DNA Kit

酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AD0401

01/产品组分

序号	组分	50 次 AD0401
1	平衡液	5 mL
2	RNase A (10 mg/mL)	150 µL
3	Lytic Enzyme	2.5 mL
4	溶液 YP1	15 mL
5	溶液 YP2	15 mL
6	溶液 YP3	20 mL
7	去蛋白液 PE	16 mL 第一次使用前加入 9.4 mL 无水乙醇
8	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇
9	洗脱缓冲液 EB	15 mL
10	吸附柱 EC	50 个
11	收集管 (2 mL)	50 个

02/保存条件

RNase A、Lytic Enzyme 于-20℃保存，溶液 YP1 于 4℃保存，其它组分室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

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 h 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，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。

推荐用量及产量：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：1-5 μL 用做 PCR 模板，5-10 μL 用于转化大肠杆菌，选择商业化的高效率的感受态细胞。

04/自备材料

无水乙醇、Sorbitol buffer（酶破壁法需自备）

Sorbitol buffer（1 M 山梨醇，0.1 M Na_2EDTA ，28 mM β -巯基乙醇）。

配制方法：在 600 mL 去离子水里面溶解 182.2 g 山梨醇，加入 200 mL 0.5 M Na_2EDTA （pH 8.0），不需要调节 PH 值，定容到 1 L，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 14 M）。

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 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。
- ◇ 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。
- ◇ 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瓶盖。
- ◇ 首次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 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！
- ◇ 将溶液 YP3 放在冰上预冷。
- ◇ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.1% β -巯基乙醇，恢复到室温备用。
- ◇ 关于平衡液的使用：取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管中，吸取 100 μL 的平衡液至柱中。12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管，备用。平衡液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。

06/使用方案

1. 取 1.5-5 mL 酵母培养物（不超过 5×10^7 cells），9,000 rpm（1,0440 $\times$ g）离心 30 s，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

▲ 收集超过 1.5 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

▲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。

2. 细胞壁的破除:

a. 酶法: 加入 300 μ L Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞; 再加入 50 μ L Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37°C 温育 1-3 h 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°C 来提高效果, 不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打, 反复冻融等。

b. 玻璃珠法: 向菌体中加入 250 μ L 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 0.1 g 直径为 0.45-0.55 mm 的酸洗玻璃珠, 涡旋振荡 10 min, 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. 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 1 min, 尽可能吸弃上清, 加入 250 μ L 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. 加入 250 μ L 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 min。

▲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 min! 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 min。

5. 加入 350 μ L 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。12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 10 min, 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。

6. 将上一步所得上清加入平衡好的吸附柱 EC 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60 s, 弃废液。

7. 加入 500 μ L 去蛋白液 PE (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60 s, 弃废液。

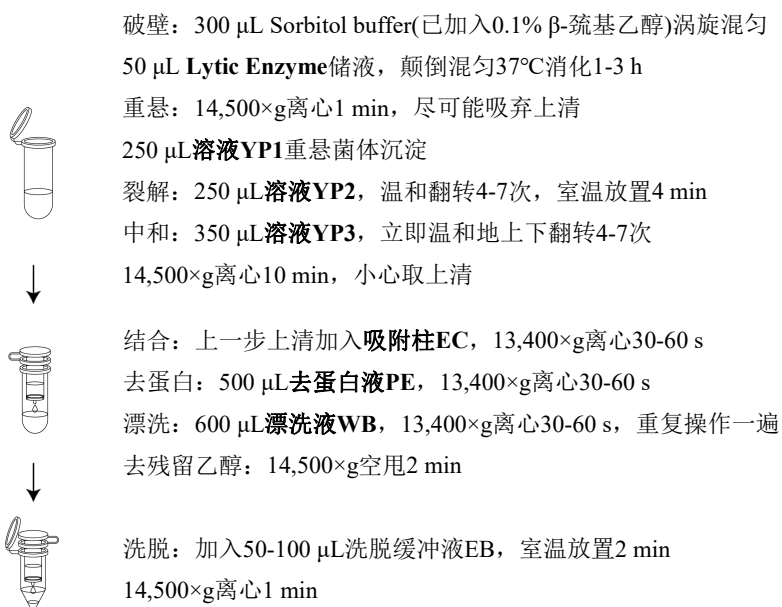
8. 加入 600 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60 s, 弃废液, 重复漂洗一遍。

9. 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 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。

10. 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 (事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 min, 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 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。

▲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, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。

07/流程简图



08/相关产品

- AA0301 SPARKeasy 酵母基因组DNA快速提取试剂盒 (含蛋白酶K)
- AA1904-A RNase A (10 mg/mL)
- AC0501 SPARKeasy 酵母RNA快速提取试剂盒 (含Lytic Enzyme)
- AD0501 SPARKeasy 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒
- EA0008 蛋白酶抑制剂混合物(真菌或酵母抽提用, 100 $\times$)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

