

Version: AD 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Maxi Yeast plasmid DNA Kit

酵母高纯质粒大量快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AD0501

01/产品组分

序号	组分	10 次 AD0501
1	RNase A (10 mg/mL)	750 µL
2	破壁酶	1 g
3	溶液 YP1	75 mL
4	溶液 YP2	75 mL
5	溶液 YP3	110 mL
6	去蛋白液 PE	63 mL 第一次使用前加入 37 mL 无水乙醇
7	漂洗液 WB	25 mL×2 第一次使用前加入 100 mL×2 无水乙醇
8	洗脱缓冲液 EB	20 mL
9	吸附柱 DC	10 个
10	收集管 (50 mL)	10 个

02/保存条件

RNase A 于 -20℃ 保存, 破壁酶于 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破壁酶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，高拷贝质粒最大得率一般为每 5 mL 培养物提取 1 µg 左右的质粒。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，选择高效率的感受态细胞。

04/自备材料

无水乙醇

用户需要自备 **Sorbitol buffer**（1 M 山梨醇，0.1 M 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 g 山梨醇，加入 200 mL 0.5 M Na₂EDTA（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 水浴加热帮助溶解，不要剧烈摇晃，以免形成过量泡沫。
- ◇ 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。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化等影响，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 PD 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 YP1 中，混匀。每次使用后置于 2-8°C 保存。
- ◇ 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。

06/使用方案

1. 取约 100-180 mL 酵母培养物，6,000×g 离心 10 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。

▲ 收集超过 50 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50 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. 加入 10 mL Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；加入 0.1 g 破壁酶（破壁酶临用前用 2 mL Sorbitol buffer 溶解），充分颠倒混匀，37°C 温育 1-2 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°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. 6,000×g离心10 min，弃上清，加入7 mL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7 mL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10 mL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 min，4°C，至少2,500×g离心20 min（加大离心力可相应缩短离心时间，如15,000×g离心10 min），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°C，2,500×g再次离心10 min，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 min，2,500×g离心2 min，倒掉收集管中的废液。

▲如果上清体积超过20 mL，可以分多次过柱。

8. 加入10 mL去蛋白液PD（请检查是否已加入无水乙醇！），2,500×g离心2 min，弃废液。

9. 加入10 mL漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），2,500×g离心2 min，弃废液，重复该步骤一遍。

10. 将吸附柱DC放回空收集管中，9,000×g以上（如果离心机转速低，需要相应延长离心时间）离心10 min以干燥膜基质残留乙醇，室温晾干几分钟。

▲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。

11. 可选步骤：选择以下两种方法之一干燥吸附柱：

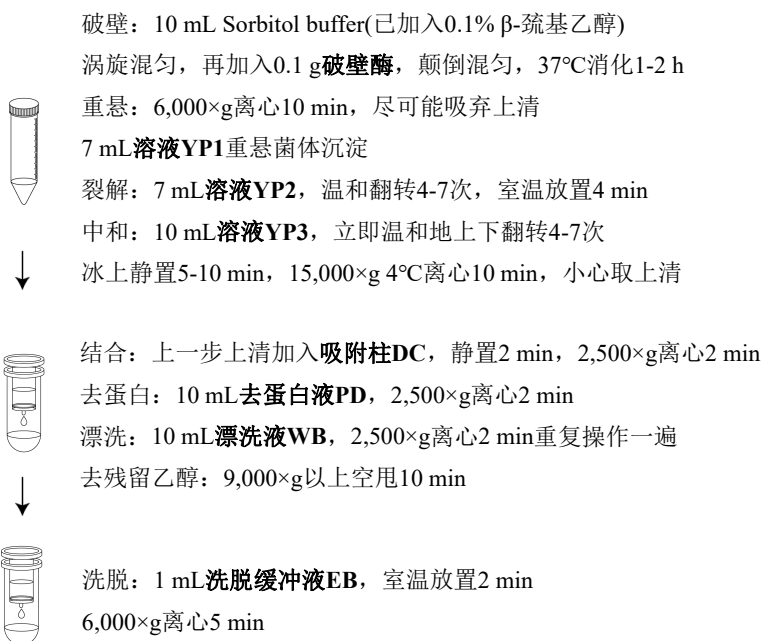
① 取下吸附柱放置于真空容器中，密封真空容器，提供真空15 min；

② 将吸附柱放置于60-65°C真空干燥箱或烘箱中，放置10-15 min。

12. 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1 mL洗脱缓冲液EB（事先在65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置2 min，6,000×g离心5 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2 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 µL，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）
- AD0401 SPARKeasy 酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒（含Lytic Enzyme）
- EA0008 蛋白酶抑制剂混合物(真菌或酵母抽提用，100×)

本产品仅用于科研使用！

Tel: 0531-82387577

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

Support: support@sparkjade.com

