

酵母质粒小提试剂盒

说明书修改日期: 2016.04.12

Cat number: KGA23100

Store at 2-8°C for 12 months

For Research Use Only(科研专用)

一、试剂盒说明

该试剂盒采用抽提酵母质粒时, 利用Snailase酶去除酵母的细胞壁, 再采用常规的碱裂解法裂解细胞, 经过沉淀、离心去除基因组DNA、蛋白质和RNA, 经吸附柱选择性地吸附DNA, 再通过简单的洗涤步骤除去非特异性结合的杂质, 洗脱得到纯度较高的质粒, 可直接用于转化、DNA测序、PCR、基于PCR的突变、体外转录、酶切等后续实验。本试剂盒具有以下特点:

- 1.采用传统的碱裂解方法和酶法相结合, 操作过程快速、方便.
- 2.无需使用酚/氯仿抽提, 无需乙醇沉淀.
- 3.抽提得到的质粒纯度高.

二、试剂盒组份

组分	KGA23100 100次	保存条件
纯化套件(吸附柱+收集管)	100套	2-8°C 12 months
Solution I	30ml	
Solution II	30ml	
Solution III	40ml	
Wash Solution	24ml	
Elution Buffer	10ml	
RNase A	4.2mg	
Snailase	600mg	
Buffer DW1	50ml	
VisuallLyse	120 μ l	
Snailase Storage Buffer	5ml	
Snailase Reaction Buffer	70ml	
操作手册	一份	

三、标准提取步骤

准备工作

- 1.自备材料：无水乙醇等。
- 2.试剂盒初次开启，取1ml Solution I 至标有RNase A的离心管中，吸打混匀后将其全部加入Solution I 中，混匀后在瓶身做好标记，储存于2-8℃，有效期为六个月。
- 3.Solution II 和Solution III在低温下可能产生沉淀，使用前请检查，如有沉淀，请于37℃溶解，冷却至室温后使用。
- 4.按瓶身标签说明在Wash Solution 中加入4倍体积的无水乙醇，混匀后在瓶身做好标记，于室温密闭保存。每次使用后将配瓶盖盖紧，以保持Wash Solution 中的乙醇含量。若Wash Solution由于运输或保管不当造成容量不准，请用量筒定容后再加入相应体积的无水乙醇。
- 5.使用前将Snailase加入Snailase Storage Buffer，混匀使酶溶解。-20℃冰箱保存备用。
- 6.提前将水浴锅调至37℃备用。

标准抽提步骤：

- 1、 在含合适抗生素的培养基中接种目标菌株，于 37℃摇床充分振荡培养 12-16h。
 - ✓ 菌液状态对质粒得率非常关键，请用不超过容器容量 1/4 体积的培养基进行培养。
 - ✓ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提得率最高，过度培养可能导致 DNA 降解。
- 2、 对于高拷贝质粒，取 1ml 酵母培养物（不超过 1×10^7 酵母细胞），室温 8000 rpm 离心 2min 收集菌体，倒尽或吸干培养基。

大部分质粒在酵母中的拷贝数较低，如需增加得率，请用 2-5ml 菌液，同时按比例相应增加 Solution I、II 和III的用量，或同一个样品分管收集，没管不超过 5ml，分别裂解，合并同一个样品的各管裂解液通过同一个吸附柱来获得更高的得率。
3. 酵母细胞壁的去 除：菌体沉淀中每 20mg 湿重加入 600 μ l 酶接缓冲液，加 1.2 μ l 的 β -巯基乙醇和 50 μ l 实验前准备好的 Snailase，37℃温浴 3h。5000rpm 离心 10min，弃上清，收集沉淀。在菌体沉淀中加入 250 μ l Solution I，吸打或振荡至彻底悬浮菌体。
 - ✓ 如果使用 lyticase，则取 600 μ l 酶解缓冲液加入菌体沉淀中，加 1.2 μ l 的 β -巯基乙醇，再加入大约含有 300U 的 Lyticase 储存液。充分混匀，37℃温浴 2h。
 - ✓ Solution I 首次使用时请检查是否已加入 Rnase A。
 - ✓ 一定要彻底悬浮菌体，否则影响得率和质量。
 - ✓ 如果使用 VisualLyse，则在加入 250 μ l Solution I 后再加入 1ul ViisualLyse，振荡混匀。
 - ✓ ViisualLyse 需在临用前加入，直接加入到 Solution I 中出现浑浊为正常现象。
4. 加入 250 μ l Solution II，立即温和颠倒离心管 5-10 次混匀，室温静置 2-4min。
 - ✓ 裂解时间与菌量相关，菌量多则适当延长时间，最长不能超过 5 分钟。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法，计时从第一管样品加入开始。
 - ✓ 以溶液由浑浊变澄清且粘稠，为裂解完全的标志。
5. 加入 350 μ l Solution III，立即温和颠倒离心管 5-10 次充分混匀。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法。加入 Solution III 后，离心管中会立即出现大量白色絮状沉淀。
 - ✓ 如果起始菌液较多，混匀后室温静置 2 分钟以彻底去除 RNA。
6. 12000rpm 离心 10min
 - ✓ 离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小悬浮物可再次离心，或延长离心时间，待完全沉淀后再取上清。
7. 将上清全部小心移入吸附柱，室温放置 2min，8000rpm 离心 2min。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✓ 吸附柱的最大有效容积为 750 μ l，如果裂解液较多，可以重复该步骤直至所有裂解液流过吸附柱。
8. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer DW1,10000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500 μ l Wash Solution, 10000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

✓ Wash Solution 首次使用前检查是否已经加入正确量的无水乙醇。

10. 将空吸附柱和收集管放入离心机, 12000rpm 离心 2min。

✓ 此步绝不可省略, 否则残余的乙醇会严重影响得率和后续实验。

11. 将吸附柱放入干净的 1.5ml 离心管中, 在吸附膜中央加入 50 μ l Elution Buffer, 室温静置 2min, 10000rpm 离心 1min。将所得到的质粒 DNA 溶液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存或后续试验。

✓ Elution Buffer 为 2.5mM Tris-HCl, Ph 8.5, 可以用 TE 或水 (Ph > 7.0) 代替。

✓ 将 Elution Buffer 预热至 60 $^{\circ}$ C 可以进一步提高得率。

✓ 如果质粒 > 8kb, 加入 Elution Buffer 后, 在 37-60 $^{\circ}$ C 温浴 2 分钟可以显著提高得率。

四、保存方法及注意事项

试剂盒于常温运输, 未开启的试剂盒可以于室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 保存, 有效期见包装。加入 RNase A 后, Solution I 请存放于 2-8 $^{\circ}$ C, 有效期为半年。