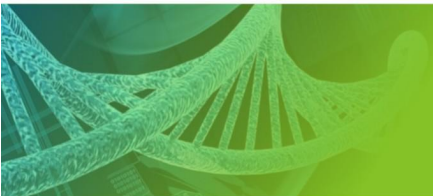


# Imagene®

## Yeast HiPure Plasmid Maxi Kit 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒



**CODONNX**  
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

## Yeast HiPure Plasmid Maxi Kit

### 酵母高纯度质粒大量快速提取试剂盒

目录号: PE114

目录编号	包装单位
PE114-01	10次

❖ 适用范围:

适用于大规模高纯度酵母质粒制备。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10次 (PE114-01)
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	750µl
破壁酶 LE	4℃	1g (常温运输)
溶液 YA	4℃	75 ml
溶液 YB	室温	75 ml
溶液 YC	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 CT (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. **第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 YA（终浓度 100 $\mu$ g/ml）置于 4 $^{\circ}$ C 保存。如果溶液 YA 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 YA 中补加 RNase A 即可。**
2. 环境温度低时溶液 YB 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37 $^{\circ}$ 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。
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。

#### ❖ 产品介绍：

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞并结合破壁酶 LE 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 LE 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世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
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。

#### ❖ 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 YC 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1μg左右的质粒。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。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50μg/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 Na<sub>2</sub>EDTA， 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 Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4℃ 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OD<sub>600</sub>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。
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，但应该确保批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℃。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 YA 中，混匀。每次使用后置于 2-8℃ 保存。
- ⇒ 将溶液 YC 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 LE（破壁酶 LE 临用前用 2ml Sorbitol buffer 溶解），充分颠倒混匀，37℃ 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 LE 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 YA 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 YB，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。

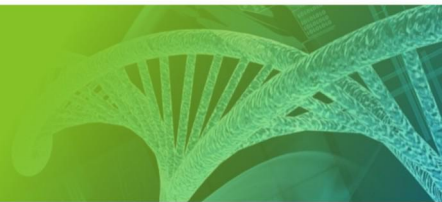
5. 加 10ml 溶液 YC，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。冰上静置 5-10 分钟，4℃，至少 2500xg 离心 20 分钟(加大离心力可相应缩短离心时间,如 15000xg 离心 10 分钟)，小心取上清，避免吸取到漂浮的白色沉淀。加入溶液 YC 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀，如果上清中还有飘浮白色沉淀，可再次离心后取上清。

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 DC 放入收集管 CT 中），静置 2 分钟，2500xg 离心 2 分钟，倒掉收集管 CT 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 CT 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°C 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°C 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。**



---

**CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd**

Yizhuang Biomedical Park  
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China  
Tel: 010-56315162 [www.codonx.com](http://www.codonx.com)