

AipFast 酵母无内毒素高纯度快速质粒大提试剂盒(离心柱型)
AipFast Yeast Endo-Free High-Pure Rapid Plasmid Maxi Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆货号：PE404

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10次(PE404-01)
RNaseA(10mg/mL)	4°C	750μL
破壁酶	4°C	1g(常温运输)
溶液 YP1	4°C	75mL
溶液 YP2	室温	75mL
溶液 YP3	室温	110mL
去蛋白液 PE	室温	63mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	25mL*2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20mL
吸附柱 DC 和收集管(50mL)	室温	10套

◆适用范围：适用于大规模高纯度酵母质粒制备。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

- 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°C 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。
- 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。
- 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。

本试剂盒提取的质粒纯度很高，并去除了大部分内毒素，除用于常规的 PCR、酶切、转化等实验外，还可以直接用于原生质体转染等一般的转染实验。

◆产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口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，克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
3. 快速方便，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5mL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。OD₂₆₀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 Na₂EDTA，14mM β-巯基乙醇)。配制方法：在600mL去离子水里面溶解182.2克山梨醇，加入200mL 0.5M Na₂EDTA(pH 8.0)，不需要调节pH值，定容到1L，4°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°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(实验前请先阅读注意事项):

提示 首次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中按照该组分标签上的指示，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°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。

注：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°C 温育 1-2 小时消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。

注 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. 离心机 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。

注：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。

注 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。12,000xg 离心 10-15 分钟，小心取上清，避免吸收到漂浮的白色沉淀。

注：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. **可选步骤：**一般不需要(4°C，12,000xg 离心 10-15 分钟，小心取上清)。

7. 将上一步所得上清加入吸附柱 DC 中(每次不超过 10mL，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10mL，以防产生漏液现象)，12,000xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

注：如果上清体积超过 20mL，可以分多次过柱。

8. 加入 10mL 去蛋白液 PE(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000xg 离心 1 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!)，12,000xg 离心 1 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 12,000xg)离心 2 分钟以干燥基质膜上残留乙醇。

注：该步骤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。

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 1mL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量)，室温放置 2 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。

推荐：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

注：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。

=====

