

## 硅胶膜酵母质粒提取试剂盒

### 一. 试剂盒货号 CAT#: YCK2010 / 产品清单:

组分名称	50T 规格/数量	100T 规格/数量	保存
Lyticase buffer	5.5ml X 1 支	11ml X 1 瓶	4°C/12个月
Lyticase	1.1ml X 1 支	2.1ml X 1 支	-20°C/12个月
溶液 YB1	15ml X 1 瓶	25ml X 1 瓶	室温/干燥
溶液 YB2	15ml X 1 瓶	25ml X 1 瓶	室温/干燥
溶液 YB3	20ml X 1 瓶	40ml X 1 瓶	室温/干燥
去蛋白液 RP	25ml X 1 瓶	50ml X 1 瓶	室温/干燥
漂洗液 BW	80ml X 1 瓶	80ml X 2 瓶	室温/干燥
洗脱缓冲液 EB	15ml X 1 瓶	15ml X 1 瓶	室温/干燥
Rnase A (10mg/ml)	150ul X 1 支	300ul X 1 支	室温/干燥
核酸纯化柱	50 套	100 套	室温/干燥
液体收集管	50 套	100 套	室温/干燥
说明书	1 份	1 份	—

### 二. 产品说明:

硅胶膜酵母质粒提取试剂盒是唯地生物开发的酵母质粒小量提取试剂盒，采用破壁酶 Lyticase 破碎酵母细胞壁，操作简单，可在两小时内提出酵母质粒，提取的质粒纯度高，可直接转化大肠杆菌感受态，用于扩繁质粒。原理：酵母细胞壁较厚，需要先用 Lyticase 消化形成原生质体后，再进行质粒提取。

### 三. 溶液 YB1 使用前需先加入 150ul RNaseA 溶液，混匀，置 2-8°C 保存。

### 四. 操作流程:

1. 取 1-5 mL 酵母培养物（不超过  $5 \times 10^7$  个酵母细胞），12000 rpm 离心 1 min，弃上清，吸干水份。
2. 加入 100  $\mu$ L Lyticase buffer，加入约 20  $\mu$ L 的 Lyticase，充分混匀，并在摇床（转速 200-220 rpm）30°C 处理 45~60 min。4000 rpm 离心 10 min，弃上清，收集沉淀。加入 250  $\mu$ L 的 YB1。注意：以上 Lyticase 的用量和处理时间为经验值，根据酵母菌菌株和酵母细胞数量不同，所用的 Lyticase 的用量和孵育时间应该进行适当调整。
3. 加入 250  $\mu$ L YB2 裂解液轻轻颠倒混匀 6-8 次（不要振荡），室温放置 5-10 min，此时菌液应变得清亮粘稠。
4. 加入 350  $\mu$ L YB3 中和液颠倒混匀 6-8 次，此时会出现白色絮状沉淀。12000 rpm 离心 10 min（如果上清中还有微小白色沉淀，可以再次离心后取上清）。
5. 上清转移至核酸纯化柱，12000 rpm 离心 1 min。
6. 步骤 5 的流出液重新倒到核酸纯化柱中，12000 rpm 离心 1 min。

7. 加入 500  $\mu$ L RP 去蛋白液，12000 rpm 离心 1 min。
8. 加入 750  $\mu$ L BW 漂洗液，12000 rpm 离心 1 min。
9. 重复步骤 8。
10. 再次离心（12000rpm，2 min）干燥柱膜，将纯化柱中的残余漂洗液去除。
11. 将纯化柱盖子打开，室温放置 3 分钟，以便纯化膜中的乙醇彻底挥发（此步骤可略过）。
12. 将纯化柱放置于一个干净的离心管中，向纯化膜中间部位加入 50  $\mu$ L 洗脱液 EB，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min 收集质粒（也可将洗脱液 65 $^{\circ}$ C 预热，或将加入洗脱液的纯化柱和新离心管一起放入 65 $^{\circ}$ C 金属浴 5 分钟，有助于提升洗脱效率）。

## 五. 关于酵母质粒拷贝数及大肠扩繁质粒的说明：

- 酵母质粒的常用复制子有两个：含 2  $\mu$  复制子的酵母质粒拷贝数为 2-5 个/Cell，含 CEN/ARS 复制子的酵母质粒拷贝数为 1 个/Cell；而大肠杆菌中质粒拷贝数通常为 50-500 个/Cell；酵母细胞的体积约 100-150 立方微米，大肠细胞的体积约 1-1.5 立方微米，这两个因素导致相同体积菌块提取的质粒，大肠是酵母的 2500-25000 倍。所以酵母提取的质粒无法通过电泳或分光光度计检测，也无法测序鉴定，无法酶切鉴定；可以作为 PCR 模板使用，也可以转化大肠杆菌扩繁质粒，通常建议使用量为：使用 2-5  $\mu$ l 用作 PCR 模板；使用 5-10  $\mu$ l 用于转化大肠杆菌。
- 转化大肠杆菌时应使用商业化的高效率感受态细胞（推荐唯地生物的 DH5  $\alpha$  Chemically Competent Cell，货号：DL1001；TOP10 Chemically Competent Cell，货号：DL1010）。

## 六. 注意事项

- 洗脱液体积不应少于 30  $\mu$  L，体积过小影响回收效率。
- 洗脱液 pH 值应在 7.0-8.5 之间，pH 低于 7.0 会影响洗脱效率。
- Lyticase 消化时间可根据菌株差异和菌体细胞量调整。
- 加入 YB2 后不要剧烈振荡，以避免基因组 DNA 断裂。
- 若产量偏低，可适当延长 Lyticase 作用时间。

## 七. 注意事项：

- 1, 点板之前，阴性对照，阳性对照，试验组的 OD 值要调一致；起始 OD600 值一般为 0.5，根据实验结果也可以调整为 0.05-1.0 之间，但阴性对照，阳性对照，试验组的 OD 值一定要调一样。
- 2, 稀释倍数可根据实验调整，可按 10 倍稀释也可按 5 倍稀释，设置 3-5 个梯度均可。