

热酚法抽提酵母 tRNA 方法探讨（实习报告：Exon20200930）

作者 屈奇奇 钟欣超 夏远梅

作者单位 广州市外显子生物技术公司 邮箱: 847146265@qq.com 电话: 020-89895006

曲奇奇: 广东韶关学院 实习单位: 广州市外显子生物技术有限公司

实验目的: 从酵母中提取 tRNA 用于制备封片剂材料

实验步骤:

- (1)将酵母细胞培养在 3ml 选择性培养基中, 30℃过夜旋转培养。
- (2)稀释过夜培养的菌液, 重新在 10ml 培养基中培养细胞。
- (3)OD600 达到 1.0 时, 收菌, 4000rpm/min 离心 5min,弃培养基。
- (4)将菌体 (或干酵母 0.1g-0.05g) 悬浮于 400 μ l AE 缓冲液 (50 mM Sodium Acetate, 10mM EDTA, pH 5.2)。
- (5)加入 1/10 体积的 10% SDS, 充分混合。
- (6)加入等体积在 65℃预热的酸性酚 (pH4.5) (实验室里 4℃的苯酚即可), 混合。
- (7)65℃加热 5min, 冰上放置 10min。
- (8) 在室温下 12000 rpm/min 离心 7-8min。
- (9)取水相,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 12000rpm/min 离心 7min。
- (10)取水相, 加入等体积氯仿/异戊醇 (49:1) 12000r/min 离心 7min
- (11)取水相, 加入 1/10 体积 3M pH5.2 的醋酸钠, 2.5 倍体积的无水乙醇, -20℃过夜沉淀。
- (12)沉淀样品于 4℃离心 6 min, 去除液体。
- (13) 沉淀中加入 500ul 冰冻 1M NaCl, 吹打沉淀 1min, 4℃ 12000 r/min, 7 min, 取上清。
- (14) 向第 13 步获取的上清中加入 2 倍体积的冰冻乙醇, -20℃ 保存 2-4 h, 4℃ 12000 rpm /min 离心, 7 min, 弃上清, 取沉淀。
- (15) 加入 500ul 的 0.3 M CH₃COONa 于第 4 步得到的沉淀中混匀, 再加入 0.54 倍体积的异丙醇, 室温下保存 5-6 min, 4℃ 12000 rpm/min 离心, 7 min, 取上清。
- (16) 将第 15 步获得的上清中加入 0.24 体积的异丙醇, -20℃ 2h 以上 (建议保存过夜), 4℃ 12000 rpm/min 离心, 7 min, 弃上清。
- (17) 用 1ml 75%乙醇洗涤沉淀, 离心, 去上清, 开盖至乙醇挥发完。再加入适当体积的 DEPC 水溶解, -80℃ 保存。

讨论与注意事项分析:

1. 第 9、10 步骤可直接合并为: 使用酚/氯仿/异戊醇 (125:24:1), 12000r/min, 7min, 但效率与原方法不同, 原方法效果高 10%, 亦可能是具体实验操作问题。
2. 一次抽提效率: 每 60mg (0.06g) 安琪牌活性干酵母, 可得 0.03mg, 提取效率为 0.05%。
摇瓶菌体湿重 0.5g 一次抽提共得 0.055mg, 一管热酚上清分两管进行酚/氯仿/异丙醇抽提共得 0.157mg (即一次实验菌体湿重不得超过 0.3g, 否则抽提效率下降), 提取效率为 0.03%
3. 可通过增长离心时间、尽量多的吸取抽提的上清液、二次抽提废液和-20 度过夜沉淀等进一步提高效率。
4. 对于单次干酵母粉添加量超过 0.1g 是否能溶解、效率是否高尚未试验。
5. 如有需要可对 (13) (15) 步抽提

材料与试剂:

- 1、AE 缓冲液 (50mM Sodium Acetate, 10mM EDTA): 0.04g/10ml 乙酸钠, 0.03g/10ml EDTA, 溶液 pH 大约为 5.5, 可不调。
- 2、3M pH5.2 的醋酸钠: 246g/L = 2.46g/10mL
- 3、1M NaCl: 58.5g/L = 1.17g/20mL
- 4、0.3 M 醋酸钠: 24.6g/L = 0.25g/10mL

货号	名称	规格	体积	价格	备注
QZZ-01	酵母 tRNA	10mg/mL	50 μ l	500 元	

地址: 广州市海珠区敦和路 189 号留学人员创业基地 2 号楼 404-405 室 邮编: 510300

网址: www.focobio.com www.focofish.com 020-89895006