

酵母质粒小提试剂盒简明说明书（BW-YD1271）

Ver: 1912

产品简介

本试剂盒可从酵母菌液中快速、可靠地提取高质量的质粒 DNA，利用 Mini Column 的可逆核酸结合特性，吸附 DNA 的同时，利用漂洗液去除蛋白质和其它不需要的杂质。然后洗脱质粒 DNA。纯化后的 DNA 可用于下游应用例如 PCR、限制性酶切和 Southern Blot。

本试剂盒可在 1 小时内纯化得到高质量的质粒 DNA，结合离心柱技术、溶壁酶（Lyticase）、玻璃珠（Glass beads）以及碱性 SDS 裂解酵母细胞。Mini Column 有利于吸附、漂洗、洗脱步骤，可以同时处理多个样品。实际得率取决于酵母菌的质粒拷贝数、菌株及生长条件。低拷贝数的 5 mL 酵母菌液可获得约 1 µg 质粒。

Mini Column 的最大质粒 DNA 结合量为 40 µg。

该方法已成功应用于从酿酒酵母里分离纯化质粒，作为一种改良的碱性裂解法，基因组 DNA 通常在纯化过程中被去除。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。加入 RNase A 的 Buffer YPI 应储存于 4°C，Lyticase 储存于 -20°C，其他试剂及用品可保存于室温（15-25°C）。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer GBL	8 mL	30 mL	150 mL
Buffer YPI	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer YPII	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer YPIII	4 mL	20 mL	100 mL
Buffer SE	6 mL	30 mL	135 mL
Buffer KB	6 mL	28 mL	135 mL
DNA Wash Buffer	3 mL	15 mL	3×24 mL
Glass Beads	10×50 mg	50×50 mg	250×50 mg
Lyticase solution	400 µL	2 mL	8 mL
RNase A (20 mg/mL)	26 µL	130 µL	650 µL
Elution Buffer	2 mL	10 mL	30 mL
User Manual	1	1	1

要点

- **RNase A:** 20 mg/mL。室温下（15-25°C）可稳定贮藏一年。使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心后加入 Buffer YPI。
- 使用后将 Buffer YPI/RNase A 置于 4°C 保存。
- **DNA Wash Buffer:** 使用前请将 12 mL（BW-YD1271-00）或 60 mL（BW-YD1271-01）或 96 mL（BW-YD1271-02）96-100% 乙醇加入至 DNA Wash Buffer 瓶内。

实验前需准备的材料

- 台式离心机和无核酸酶的 1.5 mL 离心管
- 水浴锅（30°C）

- 无水乙醇（96-100%）
- DTT (DL-Dithiothreitol)

操作步骤（离心法）

1. 于 5 mL YDP 培养基内培养携带目的质粒的酵母菌，30°C 震荡培养 16-24 h。
2. 柱平衡：向吸附柱 **Mini Column** 中加入 **500 µL Buffer GBL**，12,000 ×g 离心 1 分钟，弃去收集管中的滤液，将吸附柱重新放回收集管中备用（处理完请于当天使用）。
3. 收集 **1-3 mL** 酵母菌液（<2×10⁷ 个细胞），5,000 ×g 室温离心 5 min。
4. 弃上清液，加入 **480 µL Buffer SE** (使用前加入 **30 µL Lyticase solution**) 重悬菌体，最大速度涡旋 1 min 充分悬浮细菌细胞。充分重悬菌体有利于获得高产量。30°C 孵育 30 min 以上。

注：确保使用前加入 20 µL DTT (2M) 至 1 mL Buffer SE 中，该混合物可在室温储存 1 个月。

5. 4,000 ×g 离心 5 min，弃上清。
6. 加入 **250 µL Buffer YPI**，重悬菌体。
7. 加入 **50 mg Glass Beads**，最大速度涡旋 5 min，静置以便玻璃珠下沉，转移上清液至一个新的 1.5 mL 离心管。
8. 加入 **250 µL Buffer YPII**，颠倒旋转混匀 4-6 次直至获得澄清的裂解液。室温孵育 5 min。

注：避免剧烈混匀，否则会造成染色体 DNA 断裂，从而降低质粒的纯度。使用后拧紧 Buffer YPII 瓶盖。

9. 加入 **350 µL Buffer YPIII**，手动剧烈混匀几次直至白色沉淀漂浮物形成，13,000 ×g 室温离心 10 min。

10. 将 **Mini Column** 插入 **2 mL Collection Tube** 中。小心转移上清液至 **Mini Column**，确保没有吸到沉淀，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

11. 加入 **500 μL Buffer KB**，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液，将 **Midi Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

12. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

注：DNA Wash Buffer 作为浓缩液提供，使用前请按要求加入乙醇。

13. **可选：**重复步骤 **12**。

14. 开盖，13,000 ×g 离心 2 min，干燥柱子膜。

注：此步骤有利于去除残留的乙醇。

15. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **50-100 μL Elution Buffer**，室温静置 1 min，13,000 ×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

注：第一次洗脱可获得 75-80%的质粒，二次洗脱将回收到剩余的 DNA，但质粒浓度也会对应降低。

16. DNA 质量和得率：在 260 nm 和 280 nm 处测得稀释的质粒样品的吸光值，DNA 浓度可通过以下计算：

DNA 浓度（μg / mL）=OD₂₆₀×50×稀释倍数

操作步骤（负压/离心法）

按照离心法步骤 1-8 进行操作，进行培养、裂解、中和，接下来按照以下步骤进行。

1. 根据制造商指南安装负压设备，将 **Mini Column** 连接到负压装置上。

2. 将离心步骤 **8** 获得的上清液加入至 **Mini Column**。
3. 打开负压装置，允许裂解液通过柱子，然后关闭负压装置。
4. 加入 **500 μL Buffer KB**，打开负压装置，允许液体通过柱子。
5. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，允许液体通过柱子。
6. **可选：**重复步骤 **5**。
7. 转移 **Mini Column** 至一个 **2 mL Collection Tube**，13,000 ×g 离心 2 min。
8. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **50-100 μL Elution Buffer**，静置 1 min，13,000 ×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
低得率	裂解不完全	不要使用超过 5 mL（高拷贝质粒）或 10 mL（低拷贝质粒）菌液。
	细胞没有充分吹散	加入 Buffer YPI 后，通过涡旋使细菌悬液分散彻底，完全混匀。加入 Buffer YPII 后，充分混匀直至澄清。
	Buffer YPII 使用后没有拧紧，可能需要重新配制	按如下配制 Buffer YPII：0.2 M NaOH 和 1% SDS。
	酵母菌液不新鲜或过长时间培养	培养时间不要超过 24 h，尽量使用新鲜制备的菌液。
	低拷贝数的质粒	增加培养体积至 10 mL，对应地加大 buffer 使用量。

DNA 没洗脱下来	洗脱时，离心转速超过 13,000 ×g，基质可能脱落至洗脱下来的液体造成 OD 读数异常	若离心转速超过说明书指示，残留在洗脱液体中的基质可以与 DNA 一起纯化，不会影响 PCR 或限制性酶切。一般建议按照说明书操作进行离心。
	加入 Buffer YPI 后没有充分悬浮	重复此步骤，这次一定要用 Buffer YPIII 立即、完全混合样品。
	加入 Buffer YPII 后混合不均匀	加入 Buffer YPII 后延长孵育时间，确保没有细胞团块存在。
	DNA Wash Buffer 没有用乙醇稀释	使用前，按要求加入乙醇。
DNA 污染	加入 Buffer YPII 后过分剧烈混匀	加入 Buffer YPII 后不要涡旋振荡，温和颠倒混匀即可。
吸光度和电泳结果不一致	洗脱的质粒中含有杂质，增加了 260 nm 处的吸光值	按要求漂洗柱子，或使用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳定量。
RNA 在琼脂糖凝胶上可见	RNase A 没有加入至 Buffer YPI。	使用前在 Buffer YPI 内加入 RNase A。
点样时质粒飘出点样孔	漂洗后，乙醇没有去除干净。	按要求进行离心。

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com



倍沃医学