倍沃医学

酵母质粒小提试剂盒（BW-MYD1271）

Ver: 260701

产品简介

本试剂盒可从酵母菌是采用磁珠与质粒 DNA 的可逆性吸附系统，允许 DNA 和磁珠高效结合，而蛋白质和其他污染物在一定条件下被清除。核酸很容易用无菌水或洗脱缓冲液洗脱。纯化后的 DNA 可用于下游应用，如酶切图谱、文库筛选、测序、基因治疗和基因接种等。

本试剂盒可在 1 小时内纯化得到高质量的质粒 DNA，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 A1 应储存于 4℃，Lyticase 储存于-20℃，其他试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Plasmid-L Beads	150 uL	750 uL	4 mL
Buffer SE	3 mL	15 mL	75 mL
Buffer A1	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer B1	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer C1	3 mL	15 mL	70 mL
Lyticase solution	500 µL	2.5 mL	13 mL
RNase A (20 mg/mL)	65 µL	300 µL	1.5 mL
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℃）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 A1。
- 使用后将 Buffer A1/RNase A 置于 4℃保存。
- Buffer B1：低于室温时会沉淀，请于 37℃水浴加热至沉淀完全溶解，溶液澄清。使用后保证 Buffer B1 瓶盖拧紧。
- Plasmid-L Beads：使用前需充分涡旋混匀。建议根据自身使用情况进行分装，避免反复开盖和涡旋降低磁珠磁性，磁珠碎片增加。
- 实验前配制 75%乙醇溶液。

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（65℃）
- 无水乙醇（96-100%）
- DTT (DL-Dithiothreitol)

操作步骤（ 磁珠法 ）

1. 于 5 mL YDP 培养基内培养携带目的质粒的酵母菌，30℃震荡培养 16-24 h。

2. 收集 ***1-3 mL*** 酵母菌液（<2×10^7 个细胞），5,000 ×g 室温离心 5 min。

3. 加入 50mg 玻璃和 **50 µL** 水，最大速度涡旋 10 min，静置 1min 以便玻璃珠下沉，转移上清液至新的 1.5ml 离心管，加入 **300 µL Buffer SE** 和 **100 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℃，220rpm 震荡 60 分钟。再以 5000×g 的离心力离心 5 分钟，弃去上清液，保留沉淀。

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。

4. 加入 **200 µL Buffer A1**(使用前确保加入 RNase A)，重悬菌体。

5. 加入 **200 µL Buffer B1**，颠倒旋转混匀 4-6 次直至获得澄清的裂解液。室温孵育 4 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 BufferB1 瓶盖。

6. 加入 **200 µL Buffer C1**，手动混匀几次直至白色沉淀漂浮物形成，12,000 ×g 室温离心 10 min。

7. 转移上清液转移至一个干净的 1.5 mL 离心管中（避免吸到沉淀），加入上清液 1/2 体积的异丙醇，混匀后加入 **15 µL** Plasmid-L Beads，涡旋 1 min 左右。

注：Plasmid-L Beads 使用前需充分涡旋混匀。

8. 混匀后室温静置 5-10 min，期间需手动或涡旋混匀 3-5 次，之后上磁力架静置 1 min 左右（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

注：孵育期间一直混匀有助于提高得率。

9. 从磁力架上取下离心管，加入 600 µL 75%乙醇溶液，涡旋混匀 1 min，之后上磁力架静置 1 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

10. 重复步骤 **9**。

11. 在磁力架上晾干 5-10 min。除残留乙醇，以便获得最佳洗脱。

注：要注意观察磁珠是否过于干燥，过于干燥会影响洗脱效果。

12. 从磁力架上取下离心管，加入 50 μL Elution Buffer（65℃水浴锅预热）或者细胞培养水，涡旋混匀 1 min，孵育 5 min（可于室温或 65℃孵育），期间混匀 1-2 次再上磁力架，静置 2 min 左右（确保所有磁珠被吸附即可），吸取澄清的液体（产物）至无菌离心管中，检测后于-20℃或-80℃保存。

注：如有必要可进行二次洗脱，提高 DNA 产量。

13. 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）=OD_{260}×50×稀释倍数

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 A1 后，通过涡旋使细菌悬液分散彻底，完全混匀。加入 Buffer B1 后，充分混匀直至澄清。
	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	加入 Buffer B1 后混合不均匀	加入 Buffer B1 后延长孵育时间，确保没有细胞团块存在。
	加入 Buffer A1 后没有充分悬浮	重复此步骤，这次一定要用 Buffer B1 立即、完全混合样品。
DNA 污染	加入 Buffer B1 后过分剧烈混匀	加入 Buffer B1 后不要涡旋振荡，温和颠倒混匀即可。
RNA 在琼脂糖凝胶上可见	RNase A 没有加入至 Buffer YPI。	使用前在 BufferA1 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。	按要求进行离心晾干。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

