

版本号: 240114

Yeast genomic DNA Kit

酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: DN20

❖ 适用范围:

适用于酵母基因组DNA提取。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DN2001)	100 次 (DN2002)	200 次 (DN2003)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
缓冲液 SE	室温	15 ml	30 ml	60 ml
缓冲液 YB	室温	10 ml	20 ml	40 ml
结合液 CB	室温	11 ml	20 ml	40 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按标签指示加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	15 ml	20 ml
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml	2.5 ml × 2	2.5 ml × 4
蛋白酶 K 溶液	4°C	1 ml	1 ml × 2	1 ml × 4
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

- 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀,可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解, **恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。**
- 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中**, 常温运输。收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, -20°C 保存 2 年。
- Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液**, 因此比较粘稠, 请小心取用, -20°C 保

存。蜗牛酶是从蜗牛的腺囊和消化道中制备的混合酶，它含有纤维素酶，果胶酶，淀粉酶，蛋白酶等 20 多种酶。适合破碎溶解各种酵母的细胞壁。

4. 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：

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，用于提取酵母细胞中的基因组 DNA。无需酚氯仿等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，最大限度的去除蛋白及其他抑制性杂质。提取的 DNA 可直接用于酶切、PCR、Southern Blot 等实验。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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. 快速，简捷，单个样品裂解后操作一般可在 30 min 内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

❖ 关于平衡液的使用

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C 使沉淀完全消失。
2. **使用方法：**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μl 的平衡液至柱子中。13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 注意事项

1. 需要自备乙醇、异丙醇、 β -巯基乙醇。
2. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 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. 菌体浓度检测一般 OD600 值为 1 的时候，酿酒酵母细胞是 $1-2 \times 10^7$ 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。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中按照标签指示加入无水乙醇，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！

⇒ 吸取使用量的缓冲液 SE 加入 0.2% β -巯基乙醇，备用。

1. 取 1-3 ml 酵母培养物(不超过 3×10^7 cells，最好是早对数生长期)，13,000 rpm 离心 30 sec，**尽可能的吸弃上清**，收集菌体。
▲收集超过 1.5 ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 ml 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 300 μ l 缓冲液 SE，轻柔吹打充分重悬细胞；再加入 50 μ l Lytic Enzyme 储液，充分颠倒混匀，37°C 温育 1-3 小时消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。
▲如果破壁效果不好导致产量低，可以加大 Lytic Enzyme 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 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它酶(Lyticase) 消化或者 0.5 mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。
玻璃珠法：向菌体中加入 180 μ l 缓冲液 YB 彻底悬浮菌体，加入 0.1g 直径为 0.45-0.55 mm 的酸洗玻璃珠，涡旋振荡 10 min，静置几分钟让玻璃珠沉淀，小心吸取上清到一个新管后接后续步骤 4。
3. 13,000 rpm 离心 1 min，尽可能吸弃上清，加 180 μ l 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。
4. 加入 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。

5. 将混合物放置在 55°C 水浴消化直到消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

▲所需消化时间和酵母数量、种类和生长状态有关，一般 15 min 即可，但是如果方便的话消化过夜也无不良影响。

▲**可选步骤，一般不需要**：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成操作步骤 5 后加 20 μ l RNase A(10mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

6. 加入 200 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70°C 放置 10 min。

平衡液预处理吸附柱备用：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

7. 冷却后加入 100 μ l 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

▲上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 sec 混匀。

8. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
9. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。重复步骤 9 一遍。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 80-100°C 水浴中预热可以提高产量)，室温放置 3-5 min，13,000 rpm 离心 1 min。

▲可将第一次洗脱所得溶液重新加入离心柱中，室温放置 2 min，13,000 rpm 离心 1 min。可以提高浓度 10%左右。

▲洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 30 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

12. DNA 可以存放在-20°C，如果要长时间存放，可以放置在-70°C。