



# 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒

## Rapid Yeast DNA Kit

### 产品信息：

试剂盒组成	保存	DL121-01 50 次
缓冲液 YB	室温	20ml
结合液 CB	室温	11ml
抑制物去除液 IR	室温	25ml
漂洗液 WB	室温	15ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
Lyticase 10U/μl	-20℃	2500U
蛋白酶 K (20mg/ml)	-20℃	1ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

**保存条件：**本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。蛋白酶 K 可室温运输，建议 -20℃ 长期保存。

### 产品介绍：

该试剂盒采用 DNA 吸附柱和独有的溶液系统，适合于从多种来源的酵母培养物中快速简单地提取基因组 DNA。酵母细胞经 lyticase 处理去除细胞壁后，独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。纯化的 DNA 产物可直接用于 PCR、酶切和杂交等实验。

**菌体浓度检测：**可采用分光光度计或平板培养法检测菌体量，一般对于酿酒酵母，OD<sub>600</sub> 值为 1.0 时，相当于 1-2×10<sup>7</sup> cells/ml。

### 产品特点：

1. 重复性好：离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 提取纯度高，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。

3.简单快捷，操作安全。

#### 注意事项:

- 1.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℃ 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。
- 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.为避免降低活性，方便运输，提供 **Lyticase(2500U)为冻干粉状**，收到后，可短暂离心后，加入 **0.25 毫升灭菌水溶解配制成 10U/μl**，反复冻融可能会降低酶活性，可酌情分装-20℃保存。
- 4.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 5.**Sorbitol buffer( 1M 山梨醇， 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA， 14 mMβ-巯基乙醇)**。配制方法:称取 182.2g 山梨醇溶于 600ml 去离子水中，加入 200ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0) ，定容至 1L，溶液 4℃ 保存。临用前加入β-巯基乙醇至 0.1% 浓度(商品化的β-巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
- 6.洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保批 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在-20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl， 1mM EDTA， pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

**自备试剂:** 无水乙醇、Sorbitol buffer、β-巯基乙醇

#### 操作步骤:

##### 提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 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 Sorbitol buffer 加入 0.1%β-巯基乙醇，回复到室温备用。

- 1.取酵母培养物(不超过  $5 \times 10^7$  cells)，12,000rpm 离心 30 sec，尽可能的吸弃上清，收集菌体。
- 2.酵母细胞壁的破除：酶法：向菌体中加入 600μl 山梨醇 buffer，加入大约 50 U Lyticase 充分混匀。30℃处理 30 min，4000rpm(~1500×g)离心 10 min，弃上清，收集沉淀。  
**注意：以上为  $5 \times 10^7$  个酵母细胞的 Lyticase 用量，根据酵母的菌株和酵母细胞数量的不同，所用 Lyticase 的浓度和孵育时间应该进行适当调整。如果破壁效果不好导致 DNA 产量低，可以加大 lyticase 用量来提高酶工作浓度，还可以延长消化时间来提高效果，**

不适合 Lyticase 消化的酵母可选用 Zymolase 或者其它方法如玻璃珠涡旋，煮沸，反复冻融等破碎细胞。

3.向沉淀中加入 180μl 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。

如果需要去除 RNA，可加 4μl RNase A (10 mg/ml) 溶液 (RNA 酶客户自备)，振荡 15 sec，室温放置 5 min。

4.加入 20μl 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

5.加入 220μl 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70℃放置 10 min。

**注意：**加入缓冲液 GB 时可能会产生白色沉淀，一般 70℃放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取的 DNA 不纯。

6. 加 220μl 无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

7.将上一步混合物 (包括可能有的沉淀) 加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 12,000rpm 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。

8.加入 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 sec，弃废液。

9.加入 500μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 sec，弃掉废液。

10.重复操作步骤 9。

11.将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 离心 2 min，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

12.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 50-200μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热效果更好)，室温放置 2-5 min，12,000rpm 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000rpm 离心 1 min。(注意:DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解)