



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 酵母基因组DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1420
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 1420

目录编号	包装单位
142001	50次
142011	50次(带蛋白酶K)
142021	50次 (带Lyticase)
142031	50次 (带蛋白酶K, 带Lyticase)

❖ 适用范围:

适用于快速提取各种酵母基因组DNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

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

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

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. 为避免降低活性，方便运输，提供**蛋白酶 K 为冻干粉状 (20mg)**，收到后，可短暂离心后，加入 **1 毫升灭菌水溶解配制成 20mg/ml 溶液**，因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存，-20℃ 保存。
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**，因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存，-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，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 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。约 3ml 处于指数生长期的酵母培养液一般一次抽提可纯化出 10-15 μ g 的高质量的基因组 DNA。纯化 DNA 产物可直接用于 PCR、酶切和杂交等实验。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。

❖ 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 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. 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品裂解后操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 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。

❖ **注意事项：**

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇、异丙醇、 β -巯基乙醇。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37℃和 70℃备用。
4. 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。
5. 用户需要自备 Sorbitol buffer(1M 山梨醇， 0.1M Na_2EDTA ， 14 mM β -巯基乙醇)。配制方法：在 600 ml 去离子水里面溶解 182.2 克山梨醇，加入 200 ml 0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4℃保存。临用前加 0.1% β -巯基乙醇(商品化的 β -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。
6. 菌体浓度检测一般 OD600 值为 1 的时候,酿酒酵母细胞是 $1\text{-}2\times 10^7$ 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。
7. 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。

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

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 1-3 毫升酵母培养物(不超过 3×10^7 cells，最好是早对数生长期)，12,000rpm 离心 30 秒，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

收集超过 1.5 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5ml 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 600μl Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；可按照 20-50U/1×10⁷cells 的比例加入 Lyticase(一般 3 ml 培养物可能需要加到 150U)，充分颠倒混匀，37℃温育至少 30 分钟消化细胞壁，中间可颠倒数次帮助消化。

如果破壁效果不好导致 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。

3. 13,000rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清，加 180μl 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。
4. 加入 20μl 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。
5. 将混合物放置在 55℃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 分钟即可，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 20μl RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

-
6. 加入 200 μ l 结合液 CB, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。
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。
8. 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) 13,000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
9. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
10. 加入 700 μ l 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
11. 加入 500 μ l 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 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 100 μ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温放置 3-5 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。
- 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 50 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。**
14. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在一 20 $^{\circ}$ C。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	*某些种类酵母裂解困难-建议: 仔细阅读步骤 2, 确认处理的酵母种类可以用 lyticase 裂解, 还可以考虑选用其它裂解方法如 Zymolase、玻璃珠涡旋、煮沸、反复冻融等, lyticase 最好按照使用量分装冻存, 保证有效性, 使用早对数生长期酵母。 *蛋白酶 K 失效了-建议: 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融, 延长处理时间。 *裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-建议: 加入结合液后, 和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀; 加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱, 如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。
DNA 降解了	*组织中核酸酶活性导致降解-建议: 样品处理前妥善保存在-20℃, 处理量不要过量。
未提取到 DNA	*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议: 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议: 确保做了步骤 12, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。 *使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议: 仔细阅读注意事项 7 和步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值-建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应-建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。 *离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-建议: 确保做了步骤 12, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。