



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 酵母基因组DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 DN20
 - ◆ 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：DN20

目录编号	包装单位
DN2001	50次
DN2031	50次（带蛋白酶K，带Lytic Enzyme）

❖ 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
平衡液	室温	5 ml
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	13 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
Lytic Enzyme	-20℃	2.5 ml
蛋白酶 K 粉（可选）20mg/ml	-20℃	1 ml
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. **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℃ 室温至少保存 6 个月, 4℃ 保存 12 个月, -20℃ 保存 2 年。
3. **Lytic Enzyme** 为蜗牛酶甘油储液, 因此比较粘稠, 请小心取用, -20℃ 保存。蜗牛酶是从蜗牛的嗦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:

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 10-15μg 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 lytic Enzyme 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， OD_{260}/OD_{280} 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℃ 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 100μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，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. **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 Na₂EDTA, 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 Na₂EDTA (pH 8.0), 不需要调节 PH 值, 定容到 1L, 4℃ 保存。临用前加 0.2% 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 $1-2 \times 10^7$ cells/ml, 由于菌种和分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 0.2% 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 300μl Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞; 再加入 50μl Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37℃ 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℃来提高效果，不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5mm 玻璃珠涡旋击打，反复冻融等。玻璃珠法：向菌体中加入 180μl 缓冲液 YB 彻底悬浮菌体，加入 0.1g 直径为 0.45-0.55mm 的酸洗玻璃珠，涡旋振荡 10 分钟，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. 13,000rpm 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 200μl 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70℃放置 10 分钟。

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 100μl 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 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
10. 加入 600μl 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 600μl 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 100μl 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 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 50μl，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℃，如果要长时间存放，可以放置在-20℃。

❖ 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 lytic Enzyme 裂解，还可以考虑选用其它裂解方法如玻璃珠涡旋击打、煮沸、反复冻融等，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	*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



DNA 产量低	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。
