

Yeast DNA Kit

酵母基因组 DNA 提取试剂盒

目录号: **DNE14**

试剂盒组成

Component	DNE14 (50 preps)
Buffer SL	15 ml
Buffer VL	15 ml
Buffer WB1	25 ml
Buffer WB2(concentration)	13 ml
Buffer EB	10 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
Spin Columns AC with Collection Tubes	50

保存方法

室温（15-30°C）保存。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒适合从多种来源的酵母培养物中快速简单地提取基因组 DNA，纯化过程无需苯酚/氯仿等有机试剂。酵母细胞经 Lytic Enzyme 处理去除细胞壁后，采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他杂质可流过膜，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建等下游实验。

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，OD600 值为 1.0 时，相当于 $1-2 \times 10^7$ cells/ml。

自备试剂

无水乙醇；

Lyticase；

山梨醇 buffer：用 0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)配制 1.2 M 山梨醇（4℃ 保存）；

0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)的配制：

77.4ml 0.1mol/L Na_2HPO_4 +22.6ml 0.1mol/L NaH_2PO_4

注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
2. 储存温度低时若缓冲液 SL 或 VL 中有沉淀，可在 37℃ 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
3. 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，混匀后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

1. 取酵母细胞（最多不超过 5×10^7 个细胞）于离心管中，12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
 2. **酵母细胞壁的破除：**向菌体沉淀中加入 600 μl 山梨醇 buffer，再加入大约 50 U Lyticase（用户需自备），充分混匀。37℃ 孵育 30-60 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 min，弃上清，收集菌体沉淀。
注意：1) 以上为 5×10^7 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进行适当调整。2) 不适于 Lyticase 消化的酵母可选用其他破壁方法如玻璃珠击打、反复冻融等。
 3. 向菌体沉淀中加入 200 μl Buffer SL 和 20 μl Proteinase K (25 mg/ml) 溶液，涡旋振荡至菌体彻底悬浮。
 4. 加入 220 μl Buffer VL，涡旋振荡混匀，70℃ 孵育 10 min，水浴后溶液应变清亮。
-

-
5. 向上一步的溶液中加入 **220 μ l 无水乙醇**，涡旋混匀（此时可能会出现絮状沉淀，属于正常现象），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns AC）中。12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
 6. 向吸附柱 AC 中加入 **500 μ l Buffer WB1**，12,000 rpm 离心 30 s，倒掉废液。
 7. 向吸附柱 AC 中加入 **600 μ l Buffer WB2**（使用前请检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 30 s，倒掉废液。
 8. 重复步骤 7。
 9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，弃掉收集管和废液。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会降低洗脱效率，影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。
 10. 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5 ml 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 **50-100 μ l Buffer EB 或灭菌水**，室温放置 3-5 min，12,000 rpm 离心 1 min，收集 DNA 溶液。-20°C 保存 DNA。
注意：1) Buffer EB 提前预热可以增加产量。也可用无菌水洗脱，但应确保其 PH 在 7.0-8.5 范围内。
2) 如果要提高 DNA 的终浓度，可以使用小于 100 μ l EB 洗脱，也可以将步骤 10 所得的 DNA 溶液重新加至吸附膜上，再次离心洗脱。如果预期 DNA 的量小于 1 μ g，推荐用 50 μ l Buffer EB 进行洗脱。
-
