

酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒

BMamp 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 第一次使用前加入 60ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
Lyticase 10U/μl	-20℃	2500U
蛋白酶 K (20mg/ml)	室温	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。

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，OD₆₀₀ 值为 1.0 时，相当于 1-2×10⁷ 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,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和

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 Na₂EDTA, 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 Na₂EDTA (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 5×10^7 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 5×10^7 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，

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 180 μ l 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。

如果需要去除 RNA，可加 4 μ l 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 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

5. 加入 220 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

注意:加入结合液 CB 时可能会产生白色沉淀，一般 70 $^{\circ}$ C 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. 加入 220 μ l 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 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 sec，弃废液。

9. 加入 500 μ l 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 50-200 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 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 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。)

BM230411