

酵母基因组DNA快速提取试剂盒（含蛋白酶K、Lytic Enzyme）

产品货号：26776

产品规格：50T

产品简介：

本试剂盒采用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，可在3h内完成单个样本或多个样本的抽提工作。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高质量的基因组DNA。获得基因组DNA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，进一步将蛋白、多糖、多酚以及细胞代谢物等杂质去除，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。

产品内容：

产品名称	50T	保存条件
平衡液	5mL	室温
缓冲液 YB	20mL	室温
结合液 CB	11mL	室温
抑制物去除液 IR	25mL	室温
漂洗液 WB	15mL (第一次使用前加入60mL无水乙醇)	室温
洗脱缓冲液 EB	15mL	室温
Lytic Enzyme	2.5mL	-20℃
蛋白酶K溶液 (20mg/mL)	1mL	-20℃
吸附柱 AC	50个	室温
收集管 (2mL)	50个	室温

自备材料：

无水乙醇、异丙醇、Sorbitol buffer、β-巯基乙醇、RNase

注意事项：

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
2. 开始实验前根据需要将水浴预热到 37℃ 或者 70℃ 备用。
3. 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。
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. Sorbitol buffer（1M 山梨醇，0.1M Na₂EDTA，14mM β-巯基乙醇）配制方法：在 600mL 去离子水里面溶解 182.2g 山梨醇，加入200mL 0.5M Na₂EDTA（pH8.0），不需要调节PH值，定容到1L，4℃保存。临用前吸取出要使用的量加0.2% β-巯基乙醇（商品化的β-巯基乙醇摩尔浓度一般为14M），恢复到室温，混匀备用。
6. 菌体浓度检测一般 OD 600 值为 1 的时候，酿酒酵母细胞是 1-2×10⁷ cells/mL，由于菌种和分光光度计不同，



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

即使同样细胞数量 OD 值变化也很大，以上仅供参考。

7. 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瓶盖。
8. 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，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！
9. 关于平衡液的使用：取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管中，吸取 100 μ L 的平衡液至吸附柱中。12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管。此时平衡液预处理离心柱完毕。

使用方案：

1. 取 1-3mL 酵母培养物（不超过 3×10^7 cells，最好是早对数生长期），12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30s，尽可能的吸弃上清，收集菌体。
▲收集超过 1.5mL 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 300 μ L Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；再加入 50 μ L Lytic Enzyme，充分颠倒混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 1-3h 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 $^{\circ}$ C 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 180 μ L 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 10min，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. 12,500rpm (14,500 $\times$ g) 离心 1min，尽可能吸弃上清，加 180 μ L 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。
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. 将混合物放置在 55 $^{\circ}$ C 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 15min 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 20 μ L RNase A (25mg/mL) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10min。
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 10min。
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（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液。
9. 加入 500 μ L 抑制物去除液 IR，12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30s，弃废液。
10. 加入 600 μ L 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30s，弃掉废液。
11. 加入 600 μ L 漂洗液 WB，12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30s，弃掉废液。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,500rpm (14,500 $\times$ g) 离心 2min，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（事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好），室温放置 3-5min，12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2min，12,000rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1min。
▲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 -20 $^{\circ}$ C。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

流程简图：



收集酵母：1-3 mL酵母培养物（不超过 3×10^7 cells最好是早对数生长期） $13,400 \times g$ 离心30 s，弃培养液



破壁：300 μ L Sorbitol buffer, 50 μ L **Lytic Enzyme** 储液
37°C温育1-3 h, $14,500 \times g$ 离心1 min
180 μ L 缓冲液 **YB** 重悬酵母细胞



裂解：20 μ L 蛋白酶**K** (20 mg/mL) 55°C水浴消化完全
20 μ L **RNase A** (25 mg/mL) 振荡混匀室温5-10 min (可选)
200 μ L 结合液**CB**, 立刻涡旋振荡混匀, 70°C 10 min



结合：100 μ L 异丙醇，立刻涡旋振荡混匀
将混合物加入预处理的吸附柱**AC**, $13,400 \times g$ 离心30-60s



去抑制物：500 μ L 抑制物去除液**IR**, $13,400 \times g$ 离心30 s
去盐离子：600 μ L 漂洗液**WB** (检查是否已加入无水乙醇！)
 $13,400 \times g$ 离心30 s, 两次
去残留乙醇：空柱, $14,500 \times g$ 离心2 min



洗脱：100 μ L 洗脱液**EB** (65-70°C预热), 室温静置3-5 min
 $13,400 \times g$ 离心1 min, 可重复洗脱一次, 长期储存-20°C



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com