

Yeast DNA Kit

酵母基因组DNA提取试剂盒

目录号：AO3115

试剂盒组成

Component	AO3115 (50 T)	AO3115 (100 T)
Buffer SL	15 ml	25 ml
Buffer VL	15 ml	25 ml
Buffer WB1	25 ml	50 ml
Buffer WB2 (concentrate)	13 ml	25 ml
Buffer WB2 (concentrate)	第一次使用前按说明加指定量无水乙醇	第一次使用前按说明加指定量无水乙醇
Buffer EB	10 ml	20 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml	1 ml x 2
Spin Columns AC with Collection Tubes	50	100

保存方法

室温 (15 - 30) 保存。

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 (pH 7.4) 配制1.2 M山梨醇 (4 保存)；

0.1 M磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 的配制：

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

注意事项

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。

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。

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）

取酵母细胞（最多不超过 5×10^7 个细胞）于离心管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 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）。

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 ($\sim 13,400 \times g$) 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。

向菌体沉淀中加入200 μl Buffer SL和20 μl Proteinase K (20 mg/ml) 溶液，涡旋振荡至菌体彻底悬浮。

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。

向上一步的溶液中加入220 μl 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。

向吸附柱AC中加入500 μl Buffer WB1，12,000 rpm离心30 s，倒掉废液。

向吸附柱AC中加入600 μl 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。

重复步骤7。

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）。

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 μl 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℃ 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。