酵母基因组DNA快速提取试剂盒
（含蛋白酶K，不含Lytic Enzyme）

产品货号：26775

产品规格：50次

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	50次	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
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 A

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°C）下进行。
2. 开始实验前根据需要将水浴预热到37°C或者70°C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°C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 Na_2EDTA，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 Na_2EDTA（pH8.0），不需要调节PH值，定容到1L，4°C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。

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

6. 菌体浓度检测一般OD 600值为1的时候，酿酒酵母细胞是1-2×10^7 cells/mL，由于菌种和分光光度度计不同，即使同样细胞数量OD值变化也很大，以上仅供参考。
7. 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100μL的平衡液至吸附柱中。12,000rpm（13,400×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3×10^7cells，最好是早对数生长期），12,000rpm（13,400×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300μL Sorbitol buffer，轻柔吹打充分重悬细胞；再加入50μL Lytic Enzyme，充分颠倒混匀，37°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°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×g）离心1min，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°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20μL RNase A（25mg/mL）溶液，振荡混匀，室温放置5-10min。
6. 加入200μL结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70°C放置10min。
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（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm（13,400×g）离心30-60s，倒掉收集管中的废液。
9. 加入500μL抑制物去除液IR，12,000rpm（13,400×g）离心30s，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（13,400×g）离心30s，弃掉废液。
11. 加入600μL漂洗液WB，12,000rpm（13,400×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×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100μL洗脱缓冲液EB（事先在65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置3-5min，12,000rpm（13,400×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×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°C，如果要长时间存放，可以放置在-20°C。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.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×g离心30 s，弃培养液

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

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

结合：100 µL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×g离心30-60s

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

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

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com