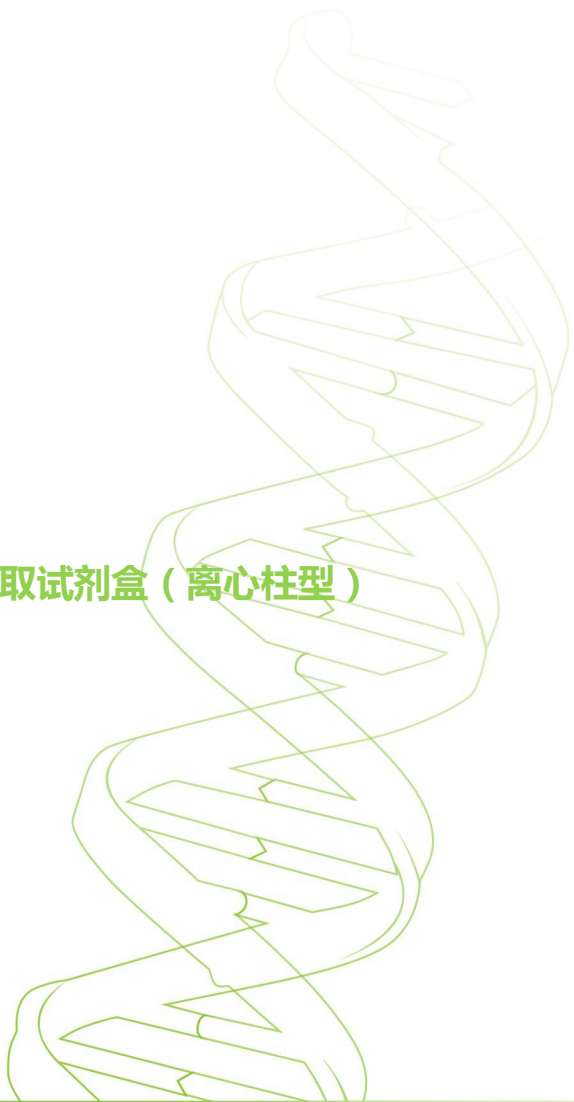


# Imagene®

## Yeast DNA Kit

## 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒（离心柱型）



**CODONX**  
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

# 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

## 目录号 DE119

### 使用说明书

网站: [www.codonx.com](http://www.codonx.com)  
咨询电话: 010-56315162  
技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/问题与解决方法

## 1/适用范围:

适用于快速提取各种酵母基因组DNA。

## 2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DE119-01)
缓冲液 Y	室温	20 ml
结合液 CB	室温	11 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml
蛋白酶 K 粉 20mg/ml	-20°C	20mg
吸附柱 DA	室温	50 个
收集管 CT (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

## 3/储存事项:

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°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。
2. 为避免降低活性, 方便运输, 提供**蛋白酶 K 为冻干粉状 (20mg)**, 收到后, 可短暂离心后, 加入**1 毫升灭菌水溶解配制成 20mg/ml 溶液**, 因为反复冻融可能会降低酶活性, 因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存, -20°C 保存。
3. **Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液**, 因此**比较粘稠, 请小心取用**, -20°C 保存。蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的混合酶, 它含有纤维素酶, 果胶酶, 淀粉酶, 蛋白酶等 20 多种酶。适合破碎溶解各种酵母的细胞壁。
4. 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盖子。

## 4/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。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 10-15 $\mu$ g 的高质量的基因组 DNA。纯化 DNA 产物可直接用于 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 在高离子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。

## 5/产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品裂解后操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

## 6/注意事项：

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇、异丙醇、 $\beta$ -巯基乙醇。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 备用。
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. 用户需要自备 Sorbitol buffer( 1M 山梨醇， 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA， 14 mM  $\beta$ -巯基乙醇)。配制方法：在 600 ml 去离子水里面溶解 182.2 克山梨醇，加入 200 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0)，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4 $^{\circ}$ C 保存。**临用前加 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇(商品化的  $\beta$ -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。**
6. 菌体浓度检测一般 OD<sub>260</sub> 值为 1 的时候,酿酒酵母细胞是 1-2 $\times 10^7$  cells/ml，由于菌种和分光光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. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ 。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。

## 7/操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

### 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 0.2%β-巯基乙醇，回复到室温备用。

1. 取 1-3 毫升酵母培养物(不超过  $3 \times 10^7$  cells，最好是早对数生长期)，12,000rpm 离心 30 秒，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

收集超过 1.5 毫升菌液，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 储液，充分颠倒混匀， $37^{\circ}\text{C}$  温育 1-3 小时消化细胞壁，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  $45^{\circ}\text{C}$  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 Y 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 10 分钟，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. 13,000rpm 离心 1 分钟，尽可能吸弃上清，加 180μl 缓冲液 Y 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  $55^{\circ}\text{C}$  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 15 分钟即可，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 $\mu$ l RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

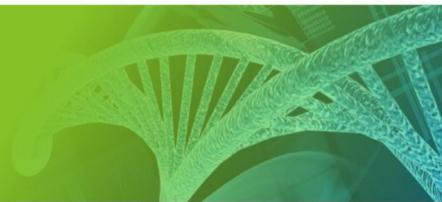
6. 加入 200 $\mu$ l 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。
7. 冷却后加入 100 $\mu$ l 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
8. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 DA 中，（吸附柱 DA 放入收集管 CT 中）13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管 CT 中的废液。
9. 加入 500 $\mu$ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
10. 加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
11. 加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
12. 将吸附柱 DA 放回空收集管 CT 中，13,000rpm 离心 2 分钟，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 DA，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 100 $\mu$ 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 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。  
**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 $\mu$ l，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 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

## 8/问题与解决方法：

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*某些种类酵母裂解困难-<b>建议</b>：仔细阅读步骤 2，确认处理的酵母种类可以用 Lytic Enzyme 裂解，还可以考虑选用其它裂解方法如玻璃珠涡旋击打、煮沸、反复冻融等，使用早对数生长期酵母。</p> <p>*蛋白酶 K 失效了-<b>建议</b>：按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融，延长处理时间。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-<b>建议</b>：加入结合液后，和</p>

加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀；加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱，如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。

DNA 降解	*组织中核酸酶活性导致降解- <b>建议</b> ：样品处理前妥善保存在-20℃，处理量不要过量。
未提取到 DNA	*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇- <b>建议</b> ： <b>第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b>
洗脱下来的 DNA 产量低	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇- <b>建议</b> ：确保做了步骤 12，否则残留乙醇会影响洗脱效率。 *使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液- <b>建议</b> ：仔细阅读注意事项 7 和步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。
A <sub>260</sub> 吸光值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值- <b>建议</b> ：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应- <b>建议</b> ：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。 *离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应- <b>建议</b> ：确保做了步骤 12，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。



---

**CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd**

Yizhuang Biomedical Park  
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China  
Tel: 010-56315162 [www.codonx.com](http://www.codonx.com)