



酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒 (Yeast Bacteria Genomic DNA Kit)

目录号：ZP302

试剂盒内容：

试剂盒组成	ZP302-1 (20次)	ZP302-2 (50次)	ZP302-3 (100次)
细胞悬浮液 (4°C保存)	15 ml	30 ml	60 ml
缓冲液 A	10 ml	15 ml	30 ml
缓冲液 B	10 ml	15 ml	30 ml
缓冲液 C	15 ml	30 ml	60 ml
漂洗液 W2	15 ml	15 ml	2×15 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
蛋白酶 K	0.2ml	0.5ml	1ml
吸附柱	20 个	50 个	100 个
收集管 (2 ml)	20 个	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份	1 份

选配试剂： RNaseA (10 mg/ml) (目录号：ZS103)；

储存条件： 该试剂盒置于室温 (15 - 25°C) 干燥条件下可保存 12 个月；更长时间的保存可置于 2 - 8°C。细胞悬浮液应置于 4°C 保存，可稳定保存半年。

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合DNA的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，用于提取酵母细胞中的基因组DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，高效、专一吸附DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组DNA片段大，纯度高，质量稳定可靠。

使用本试剂盒回收的 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、文库构建、Southern 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 $1 - 2 \times 10^7$ cells / ml。

注意事项 <请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项>

1. 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。
2. 若缓冲液 A 或 B 中有沉淀，可在 56°C 水浴中重新溶解，并摇匀后使用。
3. 所有的离心步骤均为使用台式离心机在室温下进行。

操作步骤：

使用前请先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. **离心或过滤收集菌体**：取酵母细胞（最多不超过 5×10^7 cells），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 分钟，尽量吸除上清。

2. **重悬并酶解酵母细胞壁**：加入 500 μ l 细胞悬浮液，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀，37°C 温浴 45 分钟-1 小时，每隔 5-10 分钟颠倒混匀数次。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟，尽量吸净上清。

注意：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，所用孵育时间应该进行适当调整。

3. 向菌体沉淀中加入 250 μ l 缓冲液 A，振荡至菌体彻底悬浮。

如果需要去除 RNA，可加入 6 μ l *RNaseA* (10 mg/ml) 溶液（客户自备，目录号：ZS103），振荡 15 秒，室温放置 5 分钟。

4. 向管中加入 10 μ l 蛋白酶 K 溶液，颠倒混匀。

5. 加入 250 μ l 缓冲液 B，振荡 15 秒，70°C 放置 15 分钟。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒，取上清放入一新管中，弃去沉淀。（如果上清仍然有些浑浊，属于正常现象。）

注意：a、加入缓冲液 B 时可能会产生白色沉淀，但不会影响后续实验。

b、离心后的沉淀为没有消化完全的细胞碎片及变性的蛋白，如未出现沉淀也是正常现象。

6. 加 250 μ l 无水乙醇，充分振荡混匀 15 秒，此时可能会出现絮状沉淀，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

7. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

8. 向吸附柱中加入 500 μ l 缓冲液 C，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

9. 向吸附柱中加入 700 μ l 漂洗液 W2（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

10. 向吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 W2，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒，倒掉废液。

11. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟，倒掉废液。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。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。

12. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-200 μ l 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2-5 分钟，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟，将溶液收集到离心管中。（TE 中不含 EDTA，如果产物需要长期保存，且 EDTA 不影响后续实验，建议添加终浓度 1mM 的 EDTA。）

注意：为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟。洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。

DNA 浓度及纯度检测

得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。

DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA、40 μ g/ml 单链 DNA。

OD260/OD280 比值应为 1.7 - 1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。