

酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒

产品组分

组分	N1161	N1162
消化缓冲液 DS	15 ml	30 ml
裂解液 MS	20 ml	40 ml
蛋白酶 K	1 ml	2 ml
去蛋白液 PS	30 ml	60 ml
漂洗液 PE	15 ml	30 ml
纯化液 TE	5 ml	10 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

- 裂解液 MS 中含变性剂，请不要直接接触皮肤。
- 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:3 稀释，即含 75%乙醇。
- 本试剂盒需单独购买试剂：溶壁酶（N9031/N9032）。

产品说明

本产品用于酵母基因组 DNA 的小量提取。纯化原理是利用细胞裂解液裂解细胞释放基因组 DNA，由硅胶膜柱可逆吸附基因组 DNA，经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质后，用纯化液洗脱获得基因组 DNA。本产品可从 $1-5 \times 10^7$ 的酵母细胞中提取到 3-35 μg 超纯基因组 DNA ($\text{OD}_{260/280} = 1.7-1.9$)。

质量控制

从酵母中提取 pBI121 质粒 DNA。提取的质粒 DNA 质量通过琼脂糖凝胶电泳、限制性酶切和序列测定分析。

保存条件

蛋白酶 K 于 -20°C 保存。

其余试剂置于室温 ($15-25^\circ\text{C}$) 干燥条件下保存 1 年。

如果消化缓冲液 DS 和 MS 中有沉淀，可在 55°C 加热溶解，待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 的纯化效率。

注意事项

- 溶壁酶（N9031/N9032）需要客户另行购买。
100 ml 溶壁酶反应缓冲液：77.4 ml 0.1M Na_2HPO_4 +22.6 ml 0.1M NaH_2PO_4 +21.84 g 山梨醇 (pH7.0)。
- 蛋白酶 K 请单独保存，不要与裂解液 MS 混合，如果可能，请在加入蛋白酶 K 混匀后，稍稍静置再加裂解液 MS，可以得到更好的裂解效果。
- 应尽量使用新鲜的菌体，确保提取的基因组 DNA 不被降解。
- 在操作步骤 4 中，菌体应充分悬浮，不要残留菌块，避免影响溶菌效果。
- 在操作步骤 5 中，加入无水乙醇后，可能会出现絮状沉淀，应将离心管内的溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中，确保基因组 DNA 的得率。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000 rpm (约 $13,400 \times g$)。

操作步骤

- 1 向每支 1.5 ml 离心管中加入酵母细胞液 1-5 ml (最多不超过 5×10^7 个细胞), 12,000 离心 1min, 尽量去除上清。
 - 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。
- 2 向菌体加入 600 μ l 溶壁酶反应缓冲液, 200 U 溶壁酶, 漩涡振匀, 30 $^{\circ}$ C 消化 30min。
 - 可根据收集菌体量的不同、菌种的差异, 溶壁酶比活的不同, 相应调整溶壁酶的用量及消化时间。
- 3 5,000 rpm 离心 8-10min, 去上清, 收集沉淀。向收集到的菌体沉淀中加入 200 μ l 消化缓冲液 DS, 振荡混匀。
 - 如需要去除 RNA, 可加入 4 μ l RNase A (100 mg/ml) 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5min。
- 4 加入 20 μ l 蛋白酶 K 溶液, 55 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴 30min。
- 5 加入 220 μ l 裂解液 MS, 漩涡振荡混匀, 直至形成均一的悬浮液, 65 $^{\circ}$ C 温浴 10min。溶液应变清亮, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。
 - 加入裂解液 MS 时可能会产生白色沉淀, 一般 65 $^{\circ}$ C 放置时会消失, 不会影响后续实验。如溶液未变清亮, 说明酵母细胞裂解不彻底, 可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。
 - 如菌体超过 1.5 ml, 可适当延长温浴时间。
- 6 加入 220 μ l 无水乙醇, 上下颠倒混匀, 此时可能出现絮状沉淀, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中。12,000rpm 离心 1min, 弃滤液。
 - 此时基因组 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。
 - 如柱子堵塞表明菌体过量。若发生此情况, 减少菌量, 或适当延长离心时间, 直至洗脱液顺利离心至离心管为止。
- 7 加入 500 μ l 去蛋白液 PS, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
 - 此步骤的作用是去除硅胶膜上吸附的蛋白、脂质等杂质, 以获得高质量基因组 DNA。
- 8 加入 500 μ l 漂洗液 PE, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
 - 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:3 稀释, 即含 75%乙醇。
- 9 加入 500 μ l 漂洗液 PE, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。12,000 rpm 离心 3min, 以彻底去除纯化柱中残留的液体。
 - 此步骤的作用是去除残留乙醇, 避免影响后续的酶促反应 (PCR 或酶切)。同时利于基因组 DNA 充分溶解。
- 10 将纯化柱置于新的 1.5 ml 离心管中, 向纯化柱中央处, 悬空滴加 30-100 μ l 洗脱液 TE, 室温放置 2min。
- 11 12,000 rpm 离心 2min, 管底即为高纯度基因组 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。
 - 洗脱液 TE 可用去离子水代替, 但其 pH 需为 8.0-8.5。
 - 对洗脱液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热, 会提高基因组 DNA 的产量。

Q&A

问: 基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA, 为什么?

答: 基因组 DNA 收率较低时, 可以从以下几个方面考虑:

- 1 实验材料太多, 堵塞离心柱;
- 2 溶壁酶处理时间不够, 延长处理时间;
- 3 收集培养细胞时离心力偏小, 当细胞数量小于 10^5 时, 可以适当提高离心力;
- 4 洗脱时对纯化液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热, 会提高基因组 DNA 的产量;