

酵母基因组 DNA 大量提取试剂盒说明书

货号：AC11018

规格：10T

保存：RNase A、蛋白酶K 于-20℃保存。其他室温(15℃-25℃) 干燥保存，复检期 12 个月，2℃-8℃保存时间更长。

试剂盒内容	10T	保存
RNase A	1mL×5	-20℃
蛋白酶 K	1mL×5	-20℃
酵母破壁酶	1.25mL×5	-20℃
巯基还原剂	1.5mL	2-8℃
山梨醇 Buffer	125mL	RT
溶液 A	50mL	RT
溶液 B	50mL	RT
漂洗液	15mL×2	RT
洗脱液	20mL	RT
吸附柱	10 个	RT
收集管	20 个	RT
说明书	1 份	

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，提取酵母基因组 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，能够高效专一吸附 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。使用本试剂盒提取的基因组 DNA 可用于各种常规操作，包括酶切、PCR、文库构建、Southern 杂交等实验。

操作步骤：

使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

- 1、在离心管中收集酵母细胞 20-40mL(不超过 10^9 cells), 10000rpm 离心 1min, 尽量吸除上清。
- 2、酵母细胞壁的破除：向酵母菌体中加入 9mL 山梨醇 Buffer。充分悬浮菌体，加入 600 μ L 酵母破壁酶和 100 μ L 巯基还原剂，充分混匀。30℃处理 1-2h，期间可颠倒离心管混匀数次。
- 3、10000rpm 离心 1min，弃上清，收集沉淀。
- 4、向沉淀中加入 5mL 溶液 A，充分悬浮沉淀，向悬浮液中加入 500 μ L 的 RNase A(10mg/mL)，充分颠倒混匀，室温放置 10min。
- 5、加入 500 μ L 的蛋白酶 K(10mg/mL)，充分颠倒混匀。65℃水浴消化 30-60min，消化期间可颠倒离心管混匀数次，直至样品消化完全为止。

- 6、加入 5mL 溶液 B，再加入 5mL 无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀，不影响 DNA 的提取，可将溶液和絮状沉淀都加入吸附柱中，室温放置 2min。
- 7、10000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 8、向吸附柱中加入 7mL 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)。10000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 9、向吸附柱中加入 7mL 漂洗液， 10000rpm 离心 1 min， 弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 10、10000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续实验如酶切、PCR 等。
- 11、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 1-2mL 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，10000rpm 离心 1 min。
- 12、离心所得洗脱液再加入吸附柱中，10000rpm 离心 2 min，即可得到高质量的基因组 DNA。

注意事项：

- 1、样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
- 2、若试剂盒中的溶液出现沉淀，可在 65℃水浴中重新溶解后再使用，不影响提取效果。
- 3、如果实验中的离心步骤出现柱子堵塞的情况，可适当延长离心时间。
- 4、洗脱缓冲液的体积最好不少于 1mL，体积过小会影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)， pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。
- 5、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 1.0 相当于大约 50μg/mL 双链 DNA、40μg/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。

相关文献:

- [1] Jian Dong,Guanglu Wang,Cuiying Zhang,et al. A two-step integration method for seamLess gene deletion in baker's yeast. Analytical Biochemistry. August 2013;30-36. (IF 2.275)
- [2] Haigang Tan,Jian Dong,Guanglu Wang,et al. Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. August 2014. (IF 2.533)