



## 酵母基因组 DNA 提取试剂盒

产品编号: NEP022-1

产品规格: 50T

### 产品简介:

本试剂盒采用自主研发的独特裂解液和酶相结合的方法裂解酵母, 具有效率高、速度快等特点。酵母被裂解经蛋白酶 K 消化后, DNA 被释放出来, 在高盐低 pH 的条件下, 硅基质膜特异性吸附 DNA, 在低盐高 pH 值条件下, 被吸附的 DNA 被洗脱下来。本试剂盒适用于各种酵母基因组 DNA 的提取。提取的基因组 DNA 可以直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

### 组成:

| 成分             | 50 次   | 注意事项                 |
|----------------|--------|----------------------|
| RNase A        | 0.5 ml | -20℃ 保存              |
| Proteinase K   | 1 ml   | -20℃ 保存              |
| Lysis Buffer A | 35 ml  |                      |
| Lysis Buffer B | 25 ml  |                      |
| Wash buffer A  | 24 ml  | 用前加入 16ml 无水乙醇, 充分混匀 |
| Wash buffer B  | 16 ml  | 用前加入 64ml 无水乙醇, 充分混匀 |
| TE buffer      | 10 ml  |                      |
| 离心柱            | 50 个   | 单个最大吸附量 20 µg        |

### 实验前试剂准备

Wash buffer A 中加入 16 ml 无水乙醇, 充分混匀。

Wash buffer B 中加入 64 ml 无水乙醇, 充分混匀。

### 自备试剂

Lyticase (溶壁酶, 20 mg/ml)。山梨醇缓冲液: 1M 山梨醇, 10 mmol/L EDTA pH7.5, 14mM β-巯基乙醇。

### 储存条件:

请按照上表中注意事项的条件保存, 其他未说明的可常温保存。

### 步骤:

1. 取菌液 0.6~3.0 ml (约  $1\sim5\times10^6$  个酵母), 12,000 rpm 离心 1 min, 去上清。
2. 向菌体中加入 500 µl 山梨醇缓冲液, 重悬菌体; 加入 20 µl Lyticase, 混匀, 37℃ 处理 30 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 去上清。
3. 加入 600 µl Lysis Buffer A, 漩涡重悬, 加入 20 µl Proteinase K, 60 °C 水浴 45 min~1 h, 其间颠倒混匀数次。

如需消化 RNA, 可加入 10 µl RNase A, 充分混匀, 室温放置 10 min。



若加入酵母较多，可适当延长水浴时间，适量增加 Proteinase K 的量，按比例增加 Lysis Buffer A 和 Lysis Buffer B 量。此步骤可以过夜处理。

4. 加入 400  $\mu$ l Lysis Buffer B，混匀。
5. 离心 10 min，将上清倒入离心柱中，12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。
6. 加入 700  $\mu$ l Wash buffer A（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1min，弃废液。
7. 加入 700  $\mu$ l Wash buffer B（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1min，弃废液。
8. 加入 500  $\mu$ l Wash buffer B，12,000 rpm 离心 1 min,弃废液。
9. 再次 12,000 rpm 离心 2 min，将离心柱置于新的离心管中，并打开离心柱盖，于室温或 37  $^{\circ}$ C 恒温箱放置数分钟直至无明显乙醇味。
10. 在硅基质膜中央加入 50~200  $\mu$ l TE buffer(事先预热 55~65  $^{\circ}$ C)，置于室温 2~5 min，12,000 rpm 离 2 min。

#### 纯化效果检测：

取 2-5 $\mu$ l 得到的 DNA 产物，0.7%agarose 电泳检测 DNA 分子的完整性和紫外分光光度计检测浓度和纯度。

DNA 在 260nm 处有吸收峰，检测时应该使 OD<sub>260</sub> 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD<sub>260</sub> 为 1 时大概相当于 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA，40 $\mu$ g/ml 单链 DNA。

核酸浓度 ( $\mu$ g/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 × 稀释倍数。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值应该为 1.7~2.0。

#### 常见问题分析：

| 常见问题    | 可能原因                                | 建议                                                     |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 柱子堵塞    | 裂解消化不充分                             | 适当延长 Proteinase K 消化时间，可过夜消化                           |
|         | 样品过多                                | 样品量不要超过说明书所定最大量；可适当增加 Proteinase K 的量                  |
| DNA 产量低 | 柱子堵塞                                | 加大转速和延长离心时间                                            |
|         | Wash buffer A、Wash buffer B 没有加无水乙醇 | 按说明书加入无水乙醇                                             |
|         | 洗脱效率低                               | 洗脱液使用前于 55-65 $^{\circ}$ C 预热；洗脱液 pH 值不合适，应保证在 7.5~8.5 |
|         | 样品裂解不完全                             | 适当延长裂解时间，可过夜消化                                         |
|         | 样品不够新鲜                              | 尽量使用新鲜样品                                               |
| DNA 纯度低 | 消化不完全                               | 样品量不要超过规定范围；延长消化时间，使样品充分消化                             |
|         | 洗涤不当                                | 严格按照说明书步骤洗脱                                            |
|         | 乙醇未除干净                              | 适当延长晾干时间，使乙醇充分挥发                                       |