

酵母基因组 DNA 提取试剂盒简明说明书(BW-GD2415)

产品简介

酵母基因组提取试剂盒可快速、可靠地从多种酵母中分离高质量的总细胞 DNA。一次可处理 3 mL 对数生长期的菌液(OD₆₀₀=1.0, YPD 培养基)。利用柱子基质的可逆核酸吸附特性以及柱式法快速灵活的特点, 单次可获得约 15-30 µg 的 DNA。纯化得到的 DNA 适用于 PCR、酶切消化和杂交等下游应用。酵母基因组提取试剂盒可以分离包括质粒 DNA 在内的所有细胞 DNA。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	4	50	250
DNA Mini Columns	4	50	250
2 mL Collection Tubes	4	50	250
Buffer YTL	1.0 mL	13 mL	65 mL
Buffer YBL	1.0 mL	13 mL	65 mL
Buffer KB	2.1 mL	26 mL	130 mL
DNA Wash Buffer*	2.0 mL	15 mL	3 x 24 mL
Glass Beads	210 mg	2.7 g	13 g
Elution Buffer	0.5 mL	6 mL	26 mL
Buffer SE	2.0 mL	25 mL	125 mL
Lyticase	200 µL	2200 µL	11,000 µL
Proteinase K	110 µL	1.3 mL	5 x 1.3 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	270 µL	1.4 mL
User Manual	1	1	1

注意事项

- DNA Wash Buffer: 首次使用前加入 8 mL (BW-GD2415-00) 或 60 mL (BW-GD2415-01) 或 96 mL (BW-GD2415-02) 的 96-100%乙醇至对应 DNA Wash Buffer 瓶内; 乙醇终浓度为 80%。

产品贮存及稳定性

产品自生产之日起有效期一年。Lyticase 请于 -20℃ 储存。Proteinase K 可在室温 (15-25℃) 稳定储存一年; 若要长期储存, 请分装后 -20℃ 储存。其他试剂及用品室温 (15-25℃) 保存。

实验前需准备的材料

- 离心机
- 无核酸酶的 1.5 mL 离心管
- 水浴锅 (30℃, 65℃)
- 恒温水浴摇床 (55℃)
- 无水乙醇

操作步骤一 (离心法)

1. 培养酵母菌液至 OD₆₀₀ 为 1.0。4,000 ×g 离心 10 min, 收集不超过 3 mL 的菌液 (< 2 × 10⁷)。
2. 弃上清, 加入 **480 µL Buffer SE** 和 **40 µL Lyticase**。30℃ 孵育 30 min 以上。
3. 500 ×g 室温离心 10 min。
4. 加入 **200 µL Buffer YTL**, 涡旋 5 min, 重悬细胞。

可选: 若想获得更高的 DNA 产量, 涡旋之前可加入 **30 mg Glass Beads**。

5. 加入 **20 µL Proteinase K**, 涡旋 10 s 混匀。55℃ 水浴摇床孵育

60 min, 使酵母完全裂解。若没有水浴摇床, 可以进行 55℃ 孵育, 并每隔 20-30 min 简短涡旋或震荡样品。

6. 加入 **5 µL RNase A**, 颠倒数次以混匀。室温静置 5 min。

7. 10,000 ×g 离心 5 min, 小心吸取上清并转移至无菌的离心管, 不要吸到沉淀。

8. 加入 **220 µL Buffer YBL**, 最大速度涡旋 15 s, 65℃ 孵育 10 min。加入 Buffer YBL 后可能形成纤细沉淀 (不影响 DNA 纯化)。

9. 加入 220 µL 无水乙醇, 最大速度涡旋 20 s。若此时可见沉淀, 移液器吹打混匀 10 次, 将沉淀打散。

10. 将 **DNA Mini Column** 插入 **2 mL Collection Tube**, 转移全部的混合液 (包括沉淀) 至 **DNA Mini Column** 内, 10,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液, 重复利用收集管。

11. 加入 **500 µL Buffer KB**, 10,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液, 重复利用收集管。

12. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer**, 10,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液, 重复利用收集管。

13. 将 **DNA Mini Column** 打开盖子, 12,000 ×g 离心 2 min, 此步骤对于乙醇去除很关键, 否则影响下游应用。

14. 将 **DNA Mini Column** 置于一个无核酸酶的 1.5 mL 离心管, 加入 **50-100 µL** 预热至 65℃ 的 **Elution Buffer**, 室温静置 3 min。

15. 10,000 ×g 离心 1 min, 洗脱 DNA。

可选: 将洗脱下的 DNA 二次上柱洗脱。

注: 首次洗脱可得到 60-70% DNA, 第二次洗脱会获得另外 20-30% DNA。

16. 总 DNA 的得率可通过分光光度计测定，DNA 浓度可通过以下方式计算：

$$\text{浓度} = A_{260} \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (\text{稀释倍数})$$

注：DNA 的质量可通过 260 nm 和 280 nm 处的吸光度测定，A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7-1.9 对应 85-95%纯度的 DNA。

操作步骤二（负压/离心法）

在使用该方法前请仔细阅读前面章节。

1. 根据步骤 **1-9** 准备样品和柱子。根据制造商说明准备真空负压装置，连接 **DNA Mini Column**。
2. 将样品/YBL/乙醇混合液加载到 **DNA Mini Column**，打开负压装置，使得混合液通过柱子，关闭负压装置。
3. 加入 **500 μL Buffer KB** 洗涤柱子，打开负压装置，使得溶液通过柱子，关闭负压装置。
4. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer** 洗涤柱子（使用前请按要求加入乙醇）打开负压装置，使得溶液通过柱子，关闭负压装置。
5. 按离心法的步骤 **13-15** 进行酵母 DNA 分离。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
柱子堵塞	裂解不完全	加入正确量的 Buffer YTL，55℃孵育至酵母完全裂解，如有必要适当延长孵育时间至 30 min。
	样品过量	单个柱子使用不超过 3 mL 的 OD ₆₀₀ 为 1.0 的菌液或不超过 2 ×10 ⁷ 细胞的样品。对于大体积的样品，可分成多管进行操作。
	未充分去除细胞壁	增加 Lyticase 或者延长孵育时间。如有必要延长孵育至 60 min。
低 DNA 得率	柱子堵塞	参考上述建议。
	洗脱效率低	进行二次洗脱，或增加洗脱体积。离心前于 65℃孵育 5 min 可能提高得率。
	漂洗不当	使用前按瓶身要求在 DNA Wash Buffer 内加入乙醇。
低的 A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 值	洗脱离心转速太大	可能由于离心速度太大导致膜上的树脂存在于洗脱液中，可通过离心将其除去，不会干扰 PCR 或限制酶消化。
	加入 Buffer YBL 后混匀不充分	加入 Buffer YBL 后，快速完全涡旋。
	孵育时间不够	加入 Buffer YTL 后延长孵育时间，确保无细胞团块。
DNA 没有洗脱下来	样品未与 Buffer YBL 充分混匀导致裂解不充分	Buffer YBL 加入后充分混匀，加入乙醇前于 70℃孵育。
	破壁不充分	增加 Lyticase，延长孵育时间。如有必要延长孵育至 60 min。
	DNA Wash Buffer 忘加入乙醇	在样品上柱前，按要求加入乙醇。

杭州倍沃医学科技有限公司
BIOMIGA（中国）
www.beiwobiomedical.com
400-115-2855
sales@beiwobiomedical.com

