

## 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( $OD_{600}=1.0$ , 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  $\mu$ g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 $\mu$ L	2200 $\mu$ L	11,000 $\mu$ L
Proteinase K	110 $\mu$ L	1.3 mL	5 x 1.3 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 $\mu$ L	270 $\mu$ L	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°C储存。Proteinase K可在室温(15-25°C)稳定储存一年；若要长期储存，请分装后-20°C储存。其他试剂及用品室温(15-25°C)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°C, 65°C)
- 恒温水浴摇床(55°C)
- 无水乙醇

### 操作步骤一（离心法）

1. 培养酵母菌液至 $OD_{600}$ 为1.0。 $4,000 \times g$ 离心10 min, 收集不超过3 mL的菌液( $< 2 \times 10^7$ )。
  2. 弃上清，加入480  $\mu$ L Buffer SE和40  $\mu$ L Lyticase。30°C孵育30 min以上。
  3. 500  $\times g$ 室温离心10 min。
  4. 加入200  $\mu$ L 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  $\mu$ L Proteinase K，涡旋10 s混匀。55°C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°C孵育，并每隔20-30 min简短涡旋或震荡样品。

6. 加入5  $\mu$ L RNase A，颠倒数次以混匀。室温静置5 min。
  7.  $10,000 \times g$ 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  $\mu$ L Buffer YBL，最大速度涡旋15 s, 65°C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  $\mu$ L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， $10,000 \times g$ 离心1 min，弃滤液，重复利用收集管。
  11. 加入500  $\mu$ L Buffer KB， $10,000 \times g$ 离心1 min，弃滤液，重复利用收集管。
  12. 加入600  $\mu$ L DNA Wash Buffer， $10,000 \times g$ 离心1 min，弃滤液，重复利用收集管。
  13. 将DNA Mini Column打开盖子， $12,000 \times g$ 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  $\mu$ L预热至65°C的Elution Buffer，室温静置3 min。
  15.  $10,000 \times g$ 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,  $A_{260}/A_{280}$  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°C 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 $2 \times 10^7$ 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°C 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°C 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](http://www.beiwobiomedical.com)  
400-115-2855  
[sales@beiwobiomedical.com](mailto:sales@beiwobiomedical.com)

