

版本号: DP121221

# TIANamp Yeast DNA Kit

## 酵母基因组DNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP307

### 产品内容

产品组成	DP307-02 (50 preps)
缓冲液GA (Buffer GA)	15 ml
缓冲液GB (Buffer GB)	15 ml
缓冲液GD (Buffer GD)	13 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml
洗脱缓冲液TE (Buffer TE)	15 ml
Proteinase K	1ml
吸附柱CB3 (Spin Columns CB3)	50个
收集管 (2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	50个

### 选配试剂

RNase A (100 mg/ml) (目录号:RT405-12)。

### 储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于 2-8°C。2-8°C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37°C水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。

---

## 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，用于提取酵母细胞中的基因组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，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。

使用本试剂盒回收的DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、文库构建、Southern杂交等实验。

## 菌体浓度检测

可采用分光光度计或平板培养法检测菌体量，一般对于酿酒酵母，OD600值为1.0时，相当于 $1-2 \times 10^7$  cells / ml。

**注意事项** 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量也下降。
2. 若缓冲液GA或GB中有沉淀，可在37°C水浴中重新溶解，并摇匀后使用。
3. 所有的离心步骤均为使用台式离心机在室温下进行。

## 需要自备的试剂

- 1、Lyticase（目录号：RT410）
- 2、山梨醇buffer：用0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)配制1.2 M山梨醇；

0.1M磷酸钠缓冲液(pH7.4)的配制：

77.4 ml 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 22.6ml 0.1mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

---

---

## 操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取酵母细胞（最多不超过 $5 \times 10^7$  cells），12,000 rpm (~13,400 × g) 离心1 min，尽量吸除上清（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. 酵母细胞壁的破除：

酶法：向菌体中加入600 μl 山梨醇buffer，加入大约50 U Lyticase（客户自备，目录号：RT410），充分混匀。30°C 处理30 min。4000 rpm (~1500 × g) 离心10 min，弃上清，收集沉淀。

**注意：**以上为 $5 \times 10^7$  酵母细胞的Lyticase用量，根据酵母的菌株和酵母细胞数量的不同，所用Lyticase的浓度和孵育时间应该进行适当调整。

3. 向沉淀中加入200 μl 缓冲液GA重悬沉淀，充分混匀。

**如果需要去除RNA，可加入4 μl RNase A（100 mg/ml）溶液（客户自备，目录号：RT405-12），振荡15 sec，室温放置5 min。**

4. 加入20 μl Proteinase K溶液，混匀。

5. 加入220 μl 缓冲液GB，充分颠倒混匀，70°C 放置10 min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

**注意：**加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀，一般70°C 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取的DNA不纯。

6. 加220 μl 无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

7. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CB3中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱CB3放入收集管中。

8. 向吸附柱CB3中加入500 μl 缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 × g) 离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱CB3放入收集管中。

---

---

9. 向吸附柱CB3中加入600  $\mu$ l漂洗液PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心30 sec，倒掉废液，将吸附柱CB3放入收集管中。

10. 重复操作步骤9。

11. 将吸附柱CB3放回收集管中，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

**注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。**

12. 将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50-200  $\mu$ l洗脱缓冲液TE，室温放置2-5 min，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

**注意：为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min。洗脱缓冲液体积不应少于50  $\mu$ l，体积小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防DNA降解。**

## 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OD<sub>260</sub>处有显著吸收峰，OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50  $\mu$ g/ml双链DNA、40  $\mu$ g/ml单链DNA。

OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应为1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，使用ddH<sub>2</sub>O，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。

---