

M5 HiPer Yeast Genomic DNA Kit

酵母基因组 DNA 提取试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Yeast Genomic DNA Kit	50T	MF118-01

【适用范围】 适用于快速提取各种酵母基因组 DNA

【试剂盒组成、储存、稳定性】

试剂盒组成	保存	50 次
平衡液	室温	5 ml
缓冲液 YB	室温	20 ml
结合液 CB	室温	11 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
Lytic Enzyme	-20°C	2.5 ml
蛋白酶 K 粉 20mg/ml	-20°C	1 ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

【储存注意事项】

- 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。**
- 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中**，常温运输。收到后，不超过 25°C 室温至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，-20°C 保存 2 年。
- Lytic Enzyme 为蜗牛酶甘油储液**，因此**比较粘稠，请小心取用**，-20°C 保存。蜗牛酶是从蜗牛的腺囊和消化道中制备的混合酶，它含有纤维素酶，果胶酶，淀粉酶，蛋白酶等 20 多种酶。适合破碎溶解各种酵母的细胞壁。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

【产品介绍】

该试剂盒采用 DNA 吸附柱和独有的溶液系统，适合于从多种来源的酵母培养物中快速简单地提取基因组 DNA。约 3ml 处于指数生长期的酵母培养液一般一次抽提可纯化出 10-15 μ g 的高质量基因组 DNA。纯化 DNA 产物可直接用于 PCR、酶切和杂交等实验。酵母细胞经 lytic Enzyme 处理去除细胞壁后，独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

【产品特点】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品裂解后操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

【平衡液的使用】

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37 $^{\circ}$ C 使沉淀完全消失。
2. **使用方法：**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

【注意事项】

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇、异丙醇、 β -巯基乙醇。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 备用。
4. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
5. **用户需要自备 Sorbitol buffer(1M 山梨醇， 0.1M Na₂EDTA， 14 mM β -巯基乙醇)。配制方法：**在 600 ml 去离子水里面溶解 182.2 克山梨醇，加入 200 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) ，不需要调节 PH 值，定容到 1L，4 $^{\circ}$ C 保存。**临用前加 0.2% β -巯基乙醇 (商品化的 β -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14M)。**
6. 菌体浓度检测一般 OD₆₀₀ 值为 1 的时候,酿酒酵母细胞是 1-2 $\times 10^7$ cells/ml，由于菌种和分光光度计不同即使同样细胞数量 OD 值变化也很大，以上仅供参考。
7. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影

响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20°C 。DNA 如果需要长期保存, 可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 但是 EDTA 可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

【操作步骤】(实验前请先阅读注意事项)

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!
- ⇒ 吸取使用量的 Sorbitol buffer 加入 0.2% β -巯基乙醇, 回复到室温备用。

1. 取 1-3 毫升酵母培养物(不超过 3×10^7 cells, 最好是早对数生长期), 12,000rpm 离心 30 秒, 尽可能的吸弃上清, 收集菌体。
收集超过 1.5 毫升菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 1.5ml 管内加入更多的菌液, 重复步骤 1, 直到收集到足够的菌体。
2. 加入 300 μl Sorbitol buffer, 轻柔吹打充分重悬细胞; 再加入 50 μl Lytic Enzyme 储液, 充分颠倒混匀, 37°C 温育 1-3 小时消化细胞壁, 中间可颠倒数次帮助消化。
如果破壁效果不好导致产量低, 可以加大 lytic Enzyme 用量来提高酶工作浓度, 还可以延长消化时间或者提高温度到 45°C 来提高效果, 不适合 Lytic Enzyme 消化的酵母可选用其它方法如 0.5mm 玻璃珠涡旋击打, 反复冻融等。玻璃珠法: 向菌体中加入 180 μl 缓冲液 YB 彻底悬浮菌体, 加入 0.1g 直径为 0.45-0.55mm 的酸洗玻璃珠, 涡旋振荡 10 分钟, 静置几分钟让玻璃珠沉淀, 小心吸取上清到一个新管后接后续步骤 4。
3. 13,000rpm 离心 1 分钟, 尽可能吸弃上清, 加 180 μl 缓冲液 YB 充分重悬细胞团。
4. 加入 20 μl 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml), 立刻涡旋振荡充分混匀。
5. 将混合物放置在 55°C 水浴消化直到消化完全, 期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

所需消化时间和酵母数量、种类和生长状态有关, 一般 15 分钟即可, 但是如果方便的话消化过夜也无不良影响。

可选步骤, 一般不需要: 如果 RNA 残留较多, 需要去除 RNA, 可在完成操作步骤 5 后加 20 μl RNase A(25mg/ml)溶液, 振荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。

6. 加入 200 μl 结合液 CB, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 70°C 放置 10 分钟。

平衡液预处理吸附柱备用:

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

7. 冷却后加入 100 μl 异丙醇, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 此时可能会出现絮状沉淀。
8. 将上一步混合物(包括可能的沉淀)加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
9. 加入 500 μl 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
10. 加入 600 μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
11. 加入 600 μl 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在**吸附膜的中间部位**加 100 μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴中

预热效果更好)，室温放置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

14. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

【问题与解决方法】

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*某些种类酵母裂解困难-建议：仔细阅读步骤 2，确认处理的酵母种类可以用 lytic Enzyme 裂解，还可以考虑选用其它裂解方法如玻璃珠涡旋击打、煮沸、反复冻融等，使用早对数生长期酵母。</p> <p>*蛋白酶 K 失效了-建议：按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融，延长处理时间。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-建议：加入结合液后，和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀；加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱，如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。</p>
DNA 降解了	<p>*组织中核酸酶活性导致降解-建议：样品处理前妥善保存在 -20$^{\circ}$C，处理量不要过量。</p>
未提取到 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</p>
洗脱下来的 DNA 产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议：确保做了步骤 12，否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议：仔细阅读注意事项 7 和步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。</p>
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。</p>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。</p> <p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-建议：确保做了步骤 12，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。</p>

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。