地址: 浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F 邮编: 310030 电话: 0571-87381295 传真: 0571-87381297

# 酵母 DNA 试剂盒说明书

## 产品组成

酵母 DNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备	250 次制备
Cat. No.	3401005	3401050	3401250
核酸纯化柱	5个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
RNase A	15 μ1	120 μ1	600 μ1
蛋白酶 K 贮存液	120 μ1	1.2 ml	1.2 ml×5
Buffer AT	5 ml	40 ml	200 ml
Buffer K	2 ml	20 ml	100 ml
Buffer WA(浓缩液)	1.9 ml	12 ml	60 ml
Buffer WB(浓缩液)	1.5 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	6 ml	30 ml
说明书	1 份	1 份	1份

## 产品储存

- 1. 蛋白酶 K 贮存液与 RNase A 可室温运输, 收到后请将蛋白酶 K 贮存液置于 20℃储存, RNase A 置于 2~8℃储存。
- 2. 试剂盒如果储存于常温(0~30°C),可在两年内保持使用性能无明显变化;如果将产品储存于2~8°C,可延长产品的有效期至两年以上。

## 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部: e-mail: technical@simgen.cn, 电话: 400-0099-857。

## 产品介绍

本产品适合从 5~10 ml 酵母细胞培养液中分离纯化总 DNA。酵母细胞经液氮冷冻后研磨破碎细胞,加入 Buffer AT、蛋白酶 K 贮存液释放基因组 DNA,再经 Buffer K 沉淀酵母细胞的蛋白及多糖等杂质。将含有 DNA 的上清液加入核酸纯化柱后, DNA 结合在纯化柱上,残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去, DNA 经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后,用 Buffer TE 洗脱,即可用于各种分子生物学实验。

## 用户需自备的试剂与物品

- 1. 无水乙醇
- 2. 液氮、研钵或样本裂解管 M (Simgen,Cat. No.: C-001-2)
- 3. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
- 4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
- 5. 台式小量离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子)
- 6. 旋涡振荡器
- 7. 水浴锅

#### 使用前准备

- 1. 如果离心机有制冷功能,请将温度设置到25℃。
- 2. 将水浴锅温度设置到 70℃,并将 Buffer AT 和 Buffer TE 温育至 70℃。
- 3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇,并在标签的方框中打勾做好"乙醇已加"的标记。



地址: 浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F 邮编: 310030 电话: 0571-87381295 传真: 0571-87381297

#### 操作步骤:

- 1. 收集过夜培养的酵母菌 5~10 ml 菌液, 弃尽上清。
- \* 如果用1.5 ml离心管收集酵母,可以按12000 rpm离心30秒的条件多次离心富集菌体。
- 2. 加入 100 μl 70°C预热的 Buffer AT, 勿弃吸头,直接用吸头吹打菌体沉淀, 并将其吸出转入研钵中。倒入液氮浸没菌液(菌液碰到液氮后会立即凝集成 块),用力研磨直至菌块呈粉末状。
- \* 如果菌块未能研磨成粉末状,应补加液氮继续研磨,否则将严重影响最终DNA的回收效率。
- \* 在没有液氮的条件下,可采用直接研磨约15分钟左右充分破坏细胞壁(在此过程中如果液体被蒸发掉,补加100 μl Buffer AT继续研磨)或者使用研磨效果最好的样本裂解管M(Simgen,Cat. No.: C-001-2)破坏细胞壁。详细情况见simgenbio微信公众号文章"不同研磨方法对酵母菌DNA得率的影响"。
- 3. 当研成粉末状的酵母开始融化时,向研钵中加入 500 μl Buffer AT 和 2 μl RNase A,继续研磨数次,用吸头将裂解物转入 1.5 ml 离心管,70°C水浴 5分钟。
- \* 如果裂解物少于500 μl, 补加Buffer AT至500 μl。
- 4. 加入 20 μl 蛋白酶 K 贮存液, 旋涡振荡 30 秒混匀, 70°C水浴 20 分钟。水浴 期间每隔 2~3 分钟翻转离心管数次以帮助 DNA 的释放。
- 5. 加入 350 μl Buffer K, 盖上管盖, 用力摇晃 15 秒, 旋涡振荡 30 秒混匀。13000 rpm 离心 5 分钟。
- 6. 将步骤 5 中的离心上清液倒入核酸纯化柱(核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中)中,盖上管盖,12000 rpm 离心 30 秒。
- 7. 弃 2 ml 离心管中的滤液,将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中,在核酸纯化柱中加入 500 μl Buffer WA,盖上管盖,12000 rpm 离心 30 秒。
- \* 滤液无须彻底弃尽,如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染,可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。
- \* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。
- 8. 弃 2 ml 离心管中的滤液,将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中,在核酸纯化柱中加入 600 μl Buffer WB,盖上管盖,12000 rpm 离心 30 秒。
- \* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。
- 9. 弃 2 ml 离心管中的滤液,将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中,盖上管盖,14000 rpm 离心 1 分钟。
- \* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm,则用最高速离心 2 分钟。
- \* 请勿省略该步骤,否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
- 10. 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中加入 80~100 μl 70°C预热的 Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置 2 分钟, 12000 rpm 离心 1 分钟。
- \* 如果离心机没有防泄漏的盖子,请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟,以免管盖脱落而损伤离心机。
- 11. 弃纯化柱, 洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 DNA 储存于 20℃备用。