

## 酵母基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱式）

货号： NG421S 100 次

NG421M 200 次

| 试剂盒组成     | 保存    | 100 次           | 200 次       |
|-----------|-------|-----------------|-------------|
| 溶菌酶       | 4°C   | 250 mg          | 250 mg*2    |
| 裂解液 YTL   | 室温    | 20 ml           | 40 ml       |
| 结合液 CB    | 室温    | 20ml            | 40 ml       |
| 抑制物去除液 IR | 室温    | 50 ml           | 100ml       |
| 漂洗液 WB    | 室温    | 25 ml           | 50 ml       |
|           |       | 第一次使用前按说明加指定量乙醇 |             |
| 洗脱缓冲液 EB  | 室温    | 15 ml           | 20 ml       |
| 蛋白酶 K 粉   | -20°C | 20 mg/mlx2      | 4×20 mg /ml |
| 吸附柱 AC    | 室温    | 100 个           | 200 个       |
| 收集管 (2ml) | 室温    | 100 个           | 200 个       |

### 储存事项:

1. 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。
2. 溶菌酶加入 30 ml 山梨醇 buffer 自备试剂中。
3. 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。

### 需自备试剂：

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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，取 60 ml 山梨醇 buffer 溶解溶菌酶，也可每次试验根据需要按次加。

### 产品介绍：

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。

### 注意事项:

1. 所有的离心步骤均在室温完成，离心机转速需达到13,000rpm。
2. 需要自备异丙醇。
3. 实验前将水浴预热到 70°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. 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，但应该确保批 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漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，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！

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。向菌体中加入 600 μl 山梨醇 buffer, 加入大约 2.5 mg 溶菌酶, 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。
2. 加入 180 μl 裂解液 YTL, 20 μl 的蛋白酶 K 溶液 (20mg/ml), 立刻涡旋振荡充分混匀, 56°C 水浴 1 h。
3. 加入 200 μl 结合液 CB, 20 μl RNase A (10mg/ml) 溶液, 立刻涡旋振荡充分混匀, 70°C 放置 10 分钟。
4. 冷却后加 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。
5. 用 1ml 的枪头吸取混合物, 将混合物加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000rpm 离心 60 秒, 倒掉收集管中的废液。
6. 加入 500 μl 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
7. 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。
8. 加入 600 μl 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9. 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。
10. 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 50 μl-80 μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°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。
11. DNA 可以存放在 2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20°C。