酵母基因组 DNA 提取试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF307

产品内容

产品组成	GF307-02 / (50 preps)
溶液 GA (Buffer PC)	15 ml
溶液 BG (Buffer BG)	30 ml
蛋白酶 K (20mg/ml)	1.2 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前请先加入 60ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml
吸附柱 CG1 (Spin Columns CG1)	50 个
收集管(2 ml) (Collection Tubes 2ml)	50 个

选配试剂

RNase A (100mg/ml)目录号：GF020-01

储存条件

该试剂盒置于室温（15-25℃）干燥条件下，可保存18个月，更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃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℃水浴中预热10min，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，能高效、专一吸附 DNA，可有效去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物,用来提取酵母细胞中的基因组 DNA。不需要苯酚、氯仿等有机溶剂，安全方便；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1-2×10^7 cells/ml。

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. 若溶液 GA 或溶液 BG 中有沉淀，可在 37℃水浴中重新溶解，摇匀后使用。
3. 所有离心步骤均为使用台式离心机，室温下离心。

需要自备的试剂

1. 溶壁酶 Lyticase（目录号：GF0210-01）
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 Na2HPO4+ 22.6ml 0.1mol/L NaH2PO4

操作步骤

使用前请先在漂洗液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5×10^7cells），12,000rpm(~13,400×g)离心1min，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600ul山梨醇buffer，加入大约200U Lyticase（客户自备，目录号：GF1203-01），充分混匀。30℃处理30min。4000rpm(~1500×g)离心10min，弃上清，收集沉淀。
   注意：以上为5×10^7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200ul溶液GA重悬沉淀，充分混匀。
   如果需要去除RNA，可加入4ul RNase A（100 mg/ml）溶液（客户自备，目录号：GF020-01），振荡15sec，室温放置5min。
4. 加入20ul Proteinase K溶液，混匀。
5. 加入200ul溶液BG，充分颠倒混匀，70℃放置10min，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℃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. 加入 200ul 无水乙醇，充分振荡混匀 15sec，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 CG1 中（**吸附柱放入收集管中**），12,000rpm(~13,400×g)离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CG1 放回收集管中。
8. 向吸附柱 CG1 中加入 300ul 溶液 BG，12,000rpm(~13,400×g)离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CG1 放入收集管中。
   注意：这一步骤对于清除内切酶是必不可少的，以防止污染。
9. 向吸附柱 CG1 中加入 700ul 漂洗液 PW（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），12,000rpm(~13,400×g)离心 30sec，倒掉废液，将吸附柱 CG1 放入收集管中。
10. 重复操作步骤 9。
11. 将吸附柱 CG1 放回收集管中，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，倒掉废液。将吸附柱 CG1 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 CG1 转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-200ul 洗脱缓冲液 TB，室温放置 2-5min，12,000rpm (~13,400×g)离心 2min，将溶液收集到离心管中。
    注意：洗脱液体积不应少于 50ul，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH2O 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；DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。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 CG1 中，室温放置 2min，12,000 rpm(~13,400×g)离心 2min。