

酵母基因组DNA提取试剂盒 (离心柱型)

目录号: SG091 (50次) SG092 (100次)

使用手册

2011年11月, 第7版

 北京三博远志生物技术有限公司
Beijing Sunbiotech Co. , Ltd

地 址: 北京海淀区东北旺南路 26 号

电 话: 010-62961251 62976446 传真: 010-62961251

网 址: <http://www.sunbiotech.com.cn>

Email: sunbio@sunbiotech.com.cn

 北京三博远志生物技术有限公司
Beijing Sunbiotech Co. , Ltd

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (DP1901)	100次 (DP1902)
缓冲液 SY	室温	30 ml	60 ml
裂解液 SL	室温	10 ml	20 ml
结合液 SB	室温	10 ml	20 ml
漂洗液 PW	室温	15 ml	15mlX2
		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	30 ml
蛋白酶 K (20mg/ml)	-20℃	1ml (20mg/ml)	2ml (20mg/ml)
吸附柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

- 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 PW 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！
- 20ul 20mg/ml lyticase (自备)，混匀后分装储存于-20℃保存，避免反复冻溶。
- 所有离心步骤均为室温离心。
- 若缓冲液SL和SB中有沉淀或盐析现象，可在70° C温浴溶解并混匀后使用。
- 提供**蛋白酶 K 1-2 毫升**，因为反复冻融可能会降低酶活性，因此收到后立即按照每次使用量(20 微升)分装冻存，-20℃保存。
- 避免试剂长时间暴露于空气中，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
细胞 DNA 降解了	细胞中核酸酶活性导致降解	样品处理前妥善保存在-20℃，处理量不要过量，
未提取到 DNA	漂洗液 PW 中忘记加无水乙醇	第一次实验时，在漂洗液 PW 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇	确保做了步骤 7，否则残留乙醇会影响洗脱效率，
	使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液	使用洗脱缓冲液 EB 或 pH 在 7.5-8.5 之间的去离子水洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	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。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应	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。
	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	确保做了步骤 7，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA产量低	Lyticase 破壁不彻底	延长破壁处理时间
	蛋白酶 K 失效了。	收到蛋白酶 K 后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。
	裂解不完全或者和无水乙醇没有充分混匀, 消化不好可以增加消化时间, 或过夜	加入缓冲液 SL 和蛋白酶 K 后立即吹打混匀。 加入无水乙醇后应该和裂解物充分混匀再加入吸附柱。
未提取到 DNA	漂洗液 PW 中忘记加无水乙醇	第一次实验时, 在漂洗液 PW 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇	确保做了步骤 7, 否则残留乙醇会影响洗脱效率,
	使用了非最佳液体代替洗脱缓冲液	使用洗脱缓冲液 EB 或 pH 在 7.5-8.5 之间的去离子水洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值	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。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	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	确保做了步骤 10, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。

二、原理简介

独特的裂解缓冲液/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 在高盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过漂洗, 将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后用低盐洗脱缓冲液将基因组 DNA 洗脱下来。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 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, 单个样品一小时内可获得高纯基因组 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 之间, 长度可达 23kb-50kb, 可直接用于 PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13, 000 rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 实验前将需要的水浴先预热到 70℃ 备用。
3. 结合液 SB 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。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 PW 中加入 60ml 无水乙醇!

1. 取1-3ml过夜培养的酵母菌液, 12000rpm离心1min, 尽量吸净上清。
起始处理量可以根据菌液浓度、预期产量进行调整, 但是吸附柱最大吸附能力为 30 μ g 基因组 DNA, 如果菌体过量超过最大吸附能力, 反而会严重降低产量。
2. 向菌体沉淀中加入600ul缓冲液SY, 20ul 20mg/ml lyticase (自备), 吹打混匀, 37°C放置30min以上。
如果不用lyticase破壁, 可以取消此步骤, 直接进入下步过夜。
3. 12000rpm离心2min, 弃上清, 向沉淀中加入200ul缓冲液SL和20ul 蛋白酶K溶液, 用枪头吹打混匀, 70°C放置10min。
4. 加入220ul缓冲液SB, 立即快速颠倒离心管8-10次, 彻底混匀, 70°C放置10min。
5. 12000rpm离心3min, 将上清转移到另一新的离心管中。
6. 加入220ul无水乙醇充分混匀, 全部转移至吸附柱中, 12000rpm离心1min, 倒掉废液。
加入乙醇后, 可能会出现絮状沉淀, 应将沉淀和液体全部转移到吸附柱中。
7. 向吸附柱中加入700ul漂洗液PW, 12000rpm离心30m, 倒掉废液。
8. 向吸附柱中加入500ul漂洗液PW, 12000rpm离心30m, 倒掉废液;
9. 将吸附柱放回收集管中, 12000rpm再离心2min, 去干净废液;

10. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C水浴中预热), 室温放置 3-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。

为了增加得率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 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。

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。