

Version: AA 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Yeast DNA Kit

酵母基因组DNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AA0301

01/产品组分

序号	组分	50 次 AA0301-A	50 次 AA0301-B
1	平衡液	5 mL	5 mL
2	缓冲液 YB	20 mL	20 mL
3	结合液 CB	11 mL	11 mL
4	抑制物去除液 IR	25 mL	25 mL
5	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇	
6	洗脱缓冲液 EB	15 mL	15 mL
7	Lytic Enzyme	-	2.5 mL
8	蛋白酶 K 溶液 20 mg/mL	1 mL	1 mL
9	吸附柱 AC	50 个	50 个
10	收集管 (2 mL)	50 个	50 个

02/保存条件

Lytic Enzyme、蛋白酶 K 溶液于-20℃保存，其它组分室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

本试剂盒采用 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，可在 3 h 内完成单个样本或多个样本的抽提工作。约 3 mL 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 µg 高质量的基因组 DNA。获得基因组 DNA 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 在高离序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，进一步将蛋白、多糖、多酚以及细胞代谢物等杂质去除，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。

04/自备材料

无水乙醇、异丙醇、Sorbitol buffer、 β -巯基乙醇、RNase A

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热到 37℃ 或者 70℃ 备用。
- ◇ 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℃ 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。
- ◇ 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。
- ◇ Sorbitol buffer（1 M 山梨醇，0.1 M Na_2EDTA ，14 mM β -巯基乙醇）配制方法：在 600 mL 去离子水里面溶解 182.2 g 山梨醇，加入 200 mL 0.5 M Na_2EDTA （pH 8.0），不需要调节 PH 值，定容到 1 L，4 °C 保存。临用前吸取出要使用的量加 0.2% β -巯基乙醇（商品化的 β -巯基乙醇摩尔浓度一般为 14 M），恢复到室温，混匀备用。
- ◇ 菌体浓度检测一般 OD 600 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。
- ◇ 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瓶盖。
- ◇ 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！
- ◇ 关于平衡液的使用：取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管中，吸取 100 μL 的平衡液至吸附柱中。12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管。此时平衡液预处理离心柱完毕。

06/使用方案

1. 取 1-3 mL 酵母培养物（不超过 3×10^7 cells，最好是早对数生长期），12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s，尽可能的吸弃上清，收集菌体。
 - ▲ 收集超过 1.5 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 mL 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，充分颠倒混匀，37℃ 温育 1-3 h 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 0.5 mm 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 0.1 g 直

径为0.45-0.55 mm的酸洗玻璃珠，涡旋振荡10 min，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. 12,500 rpm (14,500×g) 离心1 min，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 (20 mg/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 min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 (25 mg/mL) 溶液，振荡混匀，室温放置5-10 min。
6. 加入200 μL结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70°C放置10 min。
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（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (13,400×g) 离心30-60 s，倒掉收集管中的废液。
9. 加入500 μL抑制物去除液IR，12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，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！），12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，弃掉废液。
11. 加入600 μL漂洗液WB，12,000 rpm (13,400×g) 离心30 s，弃掉废液。
12. 将吸附柱AC放回空收集管中，12,500 rpm (14,500×g) 离心2 min，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（事先在65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置3-5 min，12,000 rpm (13,400×g) 离心1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm (13,400×g) 离心1 min。
 - ▲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 μL，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°C，如果要长时间存放，可以放置在-20°C。

07/流程简图



收集酵母：1-3 mL酵母培养物（不超过 3×10^7 cells最好是早对数生长期）13,400×g离心30 s，弃培养液



破壁：300 μ L Sorbitol buffer，50 μ L **Lytic Enzyme** 储液
37°C温育1-3 h，14,500×g离心1 min
180 μ L **缓冲液 YB** 重悬酵母细胞



裂解：20 μ L **蛋白酶K**（20 mg/mL）55°C水浴消化完全
20 μ L **RNase A**（25 mg/mL）振荡混匀室温5-10 min（可选）
200 μ L **结合液CB**，立刻涡旋振荡混匀，70°C 10 min



结合：100 μ L异丙醇，立刻涡旋振荡混匀
将混合物加入预处理的**吸附柱AC**，13,400×g离心30-60s



去抑制物：500 μ L **抑制物去除液IR**，13,400×g离心30 s
去盐离子：600 μ L **漂洗液WB**（检查是否已加入无水乙醇！）
13,400×g离心30 s，两次
去残留乙醇：空柱，14,500×g离心2 min



洗脱：100 μ L **洗脱液EB**（65-70°C预热），室温静置3-5 min
13,400×g离心1 min，可重复洗脱一次，长期储存-20°C

08/相关产品

AA1904-A RNase A（10 mg/mL）

AA1906 蛋白酶 K（10 mg/mL）

AC0501 SPARKeasy 酵母 RNA 快速提取试剂盒（含 Lytic Enzyme）

AD0401 SPARKeasy 酵母高纯质粒小量快速提取试剂盒（含 Lytic Enzyme）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

