

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1: 酵母 DNA 抽提	5
方案 2: 寄生真菌 DNA 抽提	6
常见问题回答	8

版本: 2010-01

简介

HiPure Yeast DNA Kit 为酵母细胞 DNA 提取提供了一个可靠的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。试剂盒适合于从小于 5×10^8 酵母细胞中提取高纯度的 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤液洗涤去除蛋白质和盐分子，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Yeast DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。酵母细胞经破壁酶消化去除细胞壁，酵母原生质体在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。

组 成

HiPure Yeast DNA Kit

产品编号	D3147-01	D3147-02	D3147-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads(0.4~0.6mm)	5 g	20 g	90 g
Buffer SE	6 ml	30 ml	150 ml
Lyticase	0.5 ml	1.8 ml	5 x 1.8 ml
Proteinase K	6 mg	12 mg	2 x 30 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer ATL	10 ml	30 ml	150 ml
Reagent DX	100 ul	500 ul	1500 ul
Buffer DL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Yeast DNA Kit 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。Proteinase K 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月) 建议保存于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 65℃水浴锅
- 37℃振荡水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。冻藏保存过程中，Proteinase K 才能有沉淀析出，可在 37℃水浴 0.5-1 分钟让沉淀消失。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1，并于室温保存。

D3147-01	加入 8.4 ml 无水乙醇
D3147-02	加入 17 ml 无水乙醇
D3147-03	每瓶中加入 84 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。

D3147-01	加入 24 ml 无水乙醇
D3147-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3147-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

方案 1. 酵母 DNA 抽提

该方案适合于从 $<5 \times 10^8$ 酵母细胞中提取高纯度的总 DNA。

1. 按规范流程培养酵母。取 1~1.5ml 培养液于 2ml 离心管中， $5,000 \times g$ 离心 5 分钟收集酵母细胞，小心吸弃培养液。
2. 加入 300 μ l Buffer SE，10 μ l 2-巯基乙醇和 30 μ l Lyticase 至样品中，涡旋重悬菌体，37C 振荡温育 30~60 分钟。
3. $5,000 \times g$ 离心 5 分钟收集酵母原生质体，小心吸弃上清液。
4. **加入 300 μ l Buffer ATL 至沉淀中，涡旋重悬沉淀。**
若需去除 RNA，加入 10 μ l RNase A(另外订购)至消化液中，室温放置 15 分钟去除 RNA
5. **(可选)加入~300mg 玻璃珠和 2ul Reagent DX 至样品中**，在涡旋仪上高速振荡混匀 5 分钟进一步裂解酵母细胞。
6. **加入 300 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K，涡旋混匀，70C 水浴 10 分钟。**
7. $10,000 \times g$ 离心 3 分钟去除不消化的杂质，转移 500 μ l 上清液至新的离心管。
8. 加入 250 μ l 无水乙醇至上清液中，涡旋混匀 10 秒。
9. 把 DNA 结合柱装在收集管中。**转移混合液至 DNA 结合柱中。** $10,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(己用乙醇稀释)至柱子上。** $10,000 \times g$ 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(己用乙醇稀释)至柱子中，** $10,000 \times g$ 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。 $13,000 \times g$ 离心 2 分钟甩干柱子。
13. 小心将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。 $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C或-80°C。

方案 2. 寄生真菌 DNA 抽提

该方案适合于从液体样品或动物组织中提取寄生真菌 DNA，用于 PCR 检测。

1. 按以下方案进行预处理：

- 1a. 固体样品：取 50~100mg 固体样品，加入 1ml 生理盐水，用匀浆器进行匀浆，静置 1 分钟，取 500 μ l 上清至 1.5ml 离心管中，加入 500 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟消化细胞，5,000 \times g 离心 10 分钟收集真菌细胞，小心彻底吸弃消化液。
 - 1b. 全血样品或体液样品：取小于 1ml 抗凝血液或体液，加入 1ml Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K，室温放置 15 分钟。5,000 \times g 离心 10 分钟收集真菌细胞，小心彻底吸弃消化液。
 - 1c. 粘稠的分泌物或痰液：转移 1~5ml 痰液至 15ml 离心管中，加入等倍体积的 1M NaOH(或其它痰液液化液)至样品中。室温下振荡混匀 20 分钟液化样品。5,000 \times g 离心 15 分钟，小心吸弃所有的上清液，按第 2 步进行操作。
2. (可选)加入 100 μ l Buffer SE, 2 μ l 2-巯基乙醇和 30 μ l Lyticase 至沉淀中，涡旋混匀。37 度放置 30 分钟。
 3. 加入 200 μ l Buffer ATL、2 μ l Reagent DX 和 300mg 玻璃珠至沉淀中，在涡旋仪上高速振荡混匀 5~10 分钟。
 4. 静置 1 分钟，转移上清液至新的离心管。
 5. 加入 250 μ l Buffer DL 和 250 μ l 无水乙醇至样品中，涡旋 15 秒混匀。
 6. 把 DNA 结合柱装在收集管中。转移混合液至 DNA 结合柱中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
 7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
 8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 \times g 离心 30-60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子。
10. 小心将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C或-80°C。

常见问题解答

现象	原因及解决方法
DNA 产量低	
样品 DNA 含量低	重新提取时在 Buffer DL 中加入 2 μ l Carrier DNA 或鲑鱼精 DNA 以提高提取 DNA 的回收效率。
柱子堵塞	样品用量太多，或 Proteinase K 活性下降，或没有充分裂解，样品消化先离心去除未消化的样品
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20 $^{\circ}$ C。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
洗脱效率不够	洗脱时 Elution Buffer 预热至 55 $^{\circ}$ C，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。
Buffer GW1 和 Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
细菌细胞壁裂解不充分	破壁酶失活或细胞壁去除不够彻底
OD260/OD280 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNASE 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20 $^{\circ}$ C。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
Buffer GW1 和 Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。