

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 5×10^7 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
Buffer SE	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer ATL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer DL	3 ml	15 ml	80 ml
Buffer GW1	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Lyticase Mixture	400 µl	1.8 ml	5 x 1.8 ml
Proteinase K	4 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	2 ml	12 ml
Glass Beads(0.4~0.6mm)	2 g	10 g	30 g
Buffer AE	3 ml	20 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Yeast DNA Kit 除 Proteinase K 和 Lyticase 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 和 Lyticase 干粉室温运输，收到试剂盒后请保存于 2-8℃ 或 -20℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 2-巯基乙醇
- (可选) 一管 50mg/ml RNase A 溶液
- 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 5.6 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 20 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 $<5 \times 10^7$ 酵母细胞中提取高纯度的总 DNA。

1. 按规范流程培养酵母，并计算酵母细胞数量(5×10^7)。

酵母生长情况可以通过分光光度计进行测量。由于不同仪器的差别和各种生长条件的影响，很难给出 OD 值与酵母细胞数量之间的精确可靠的关系。例如：每毫升含 2×10^7 个酵母细胞的培养液，稀释 4 倍后，在 Beckman DU-40 测量时，OD600 为 0.125；在 DU-7400 测量时，OD600 为 0.25。因此我们建议使用平板计数法来较准仪器测量的 OD 值。测量 OD 值时，需对样品进行稀释或浓缩，以确保读数在 0.05-0.3 的可信区间内。

2. 4℃, 5,000 x g 离心 5 分钟收集酵母细胞，小心吸弃培养液。

3. 加入 500µl Buffer SE、10µl 2-巯基乙醇和 30µl Lyticase Mixture 至样品中。涡旋重悬细胞，37℃ 振荡水浴 30~60 分钟。

处理多个样品时，Buffer SE, 2-巯基乙醇和 20µl Lyticase 可预先按比例进行混合。

4. 5,000 x g 离心 5 分钟收集酵母原生质体，小心彻底吸弃消化液。

5. 加入 250µl Buffer ATL 和 10µl Proteinase K 至沉淀中。涡旋重悬沉淀，65℃ 水浴 30 分钟。

若需去除 RNA，加入 5µl RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 10~30 分钟消化去除 RNA。

6. (可选)若消化液中有明显的颗粒或显浑浊状，10,000 x g 离心 3 分钟去除不消化的杂质，转移上清液至新的离心管中再进行下一步的操作。

7. 加入 250µl Buffer DL 和 250µl 无水乙醇至消化液或上清液中，涡旋 20 秒混匀。

为减少加液的次数，Buffer DL 和无水乙醇可以预先混合。

8. 把 HiPure DNA Mini Columns I 装在收集管中。转移混合液至 DNA 结合柱中。10,000 x g 离心 30~60 秒。

9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000 x g 离心 30-60 秒。

10. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 x g 离心 30-60 秒。

11. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 300 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，10,000 \times g 离心 2 分钟。

这一步可去除柱子中残留的乙醇，不要改变离心时间。取出柱子时须小心，不要让柱子的底部接触到收集管中的溶液。若碰到溶液，可倒弃收集管中的滤液，把柱子重新装入收集管中。12,000 \times g 离心 1 分钟。

12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 50~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。

13. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央。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 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ 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 20~50mg 固体样品剪切成小碎片，并转移至 1.5ml 离心管中，加入 300 μ l Buffer ATL。
 - 1b. **全血样品(红细胞不带核)：**取 1ml 抗凝血液至 2ml 离心管中，300 μ l Buffer ATL 和 300 μ l 灭菌水，颠倒混匀 6-8 次，室温放置 3~5 分钟。10,000 \times g 离心 5 分钟收集真菌细胞，倒弃上清液，300 μ l Buffer ATL 重悬细胞沉淀。
 - 1c. **分泌物或血清等：**10,000 \times g 离心 5 分钟收集真菌细胞，倒弃上清液，加入 250 μ l Buffer ATL，立即用移液枪吸打重悬细胞；
 - 1d. **痰液样品：**转移痰液至离心管中，加入等倍体积的 NaOH-NALC(需另外订购)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 分钟收集真菌，小心吸弃所有的上清液，按第四步进行操作。
2. **加入 10 μ l Proteinase K 至样品中，颠倒混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 30~60 分钟消化真核细胞。**
 3. 5,000 \times g 离心 10 分钟收集真菌细胞，小心彻底吸弃消化液。
 4. **加入 0.5ml Buffer SE、10 μ l 2-巯基乙醇和 20 μ l Lyticase 至沉淀中，涡旋重悬细胞，37 $^{\circ}$ C 振荡水浴 30~60 分钟。**
 5. 5,000 \times g 离心 10 分钟收集原生质体，小心彻底吸弃消化液。
 6. **加入 200 μ l Buffer ATL 至沉淀中，涡旋重悬细胞。95 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟。**
处理难裂解的真菌细胞，加入 100mg 酸性玻璃珠(0.4~0.6mm)至样品中，高速涡旋 3 分钟，然后于 95 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟，静置 1 分钟后转移溶液至新的离心管中再继续下一步操作。
 7. **加入 200 μ l Buffer DL 和 200 μ l 无水乙醇至样品中，涡旋 15 秒混匀。**
为减少加液的次数，Buffer DL 和无水乙醇可以预先混合。
 8. **把 DNA 结合柱装在收集管中。转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 60 秒。**

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 600µl Buffer GW2, 8,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 300µl Buffer GW2 至柱子中。12,000 × g 离心 3 分钟。
11. 小心将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 20~50 µl 预热至 55°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。

常见问题解答

现象	原因及解决方法
DNA 产量低	重新提取时在 Buffer DL 中加入 2µl Carrier DNA 或鲑鱼精 DNA 以提取 DNA 的回收效率。
样品 DNA 含量低	样品用量太多, 或 Proteinase K 活性下降, 或没有充分裂解
柱子堵塞	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°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°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°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。