

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: 2024-01

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
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
玻璃珠(0.1-0.6mm)	10 g	50 g	250 g
Buffer Y1	6 ml	30 ml	150 ml
Lyticase Mixture	0.5 ml	1.8 ml	5 × 1.8 ml
Proteinase K Solution	0.15 ml	0.6 ml	2.8 ml
RNase Solution	0.1 ml	0.3 ml	1.3 ml
Buffer DL	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 × 50 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

Buffer AE 成分：10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

保 质 期

HiPure Yeast DNA Kit 室温下运输，收到产品后，把 Lyticase Mixture, RNase Solution, Proteinase K Solution 保存于 2-8°C 或-20°C。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 70℃水浴锅
- 37℃振荡水浴锅
- 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. 酵母或寄生真菌 DNA 抽提(酶法)

该方案适合于酵母培养液 ($<1 \times 10^7$ 酵母细胞) 或其它体液样品中提取高纯度的酵母或真菌 DNA。

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液, 以减少加液次数, 混和液可以 2-8°C 放置 1 周。一份样品: 270 μ l Buffer Y1、30 μ l Lyticase Mixture 和 3 μ l 2-巯基乙醇。
1. 取 0.5~1.8ml 酵母培养液 (不要超过 1×10^7)、体液、痰液液化液、分泌液、拭子浸泡液等液体样品至 2ml 离心管中, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集酵母或真菌细胞, 小心吸弃液体。
建议处理每次湿重不要超过 100mg 的酵母细胞。
 2. 加入 300 μ l Lysis Mixture 至样品中, 涡旋重悬菌体, 37°C 振荡温育 30~60 分钟。
 3. 加入 200 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K, 涡旋混匀 5 秒, 65°C 温育 20 分钟。
 4. 加入 5 μ l RNase Solution, 颠倒混匀, 室温放置 15 分钟。13,000 \times g 离心 3 分钟。
 5. 转移 500 μ l 上清液至新的离心管, 加入 250 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀 10 秒。
 6. 把 DNA 结合柱装在收集管中。转移全部混合液至 DNA 结合柱中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
 7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1 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 650 μ l Buffer GW2 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。10,000 \times 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 \times g 离心 1 分钟。
 11. 再加入 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。
 12. 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. 酵母或寄生真菌物 DNA 抽提（珠磨法）

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液，以减少加液次数，混和液可以 2-8°C 放置 1 周。一份样品：310 μ l Buffer Y1、5 μ l RNase A、30 μ l Lyticase Mixture 和 5 μ l 2-巯基乙醇。
1. **样品前处理（离心富集微生物）**
 - **微生物培养液:** 取 0.5~1.8ml 细菌、酵母或真菌培养液至 2.0ml 离心管，10,000 \times g 离心 3 分钟收集真菌，倒弃培养液。
建议处理每次湿重不要超过 100mg 的酵母细胞或真菌菌丝体，以及湿重不超过 40mg 细菌。
 - **大体积体液（低细胞含量）:** 取 1.0~1.8ml 血清、血浆、积液、培养液上清、痰液液化液、分泌液、尿液、灌洗液、唾液等至合适的离心管中，10,000 \times g 离心 10 分钟收集微生物，倒弃液体。
 2. 加入 0.35ml Lysis Mixture 和 1 勺玻璃珠(0.1-0.6mm)至含有微生物的离心管中，高速涡旋混匀 10 分钟（或珠磨仪上珠磨 30~60 秒）裂解细菌。
 - 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。
 - PowerLyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
 - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
 3. 加入 300 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K，涡旋混匀 5 秒，70°C 温育 10 分钟。
 4. 13,000 \times g 离心 1 分钟去除不消化的杂质。
 5. 转移 500 μ l 上清液至新的离心管，加入 250 μ l 无水乙醇，涡旋混匀 10 秒。
 6. 把 DNA 结合柱装在收集管中。转移全部混合液至 DNA 结合柱中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
 7. 倒弃滤液，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 × g 离心 30-60 秒。

8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 × g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000 × 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 30~50µl 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. 再加入 30~50µl 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。
12. 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 Buffer AE 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。