

D3370 Yeast DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释以下试剂

- 使用前，溶解 lyticase 至 2500Unit/mL，保存于-20℃，使用前解冻，每个样品使用 20μl。按以下方法溶解。

货号	加入量
D3370-00	加入 100μl Buffer SE 溶解
D3370-01	加入 1mL Buffer SE 溶解
D3370-02	每管加入 1mL Buffer SE 溶解

- 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3370-00	8mL
D3370-01	80mL
D3370-02	80mL (每瓶)

提取步骤：

1. 指数生长期酵母培养液通过 YPD 测定 OD₆₀₀ 为 1.0;
2. 取不多于 3mL (<2×10⁷ 个细胞) 的培养液进行室温 4,000xg 离心 10min;
3. 弃上清，加 480μl Buffer SE，10μl β-巯基乙醇和 20μl lyticase solution，30℃水浴不少于 30min;
4. 室温 4,000xg 离心 5min，弃上清，得到沉淀;
5. 加 200μl Buffer YL，50mg glass beads (0.4-0.6mm)，涡旋 3-5min，将上清转移到新的 1.5mL 的离心管中;
6. 加 25μl Proteinase K solution，涡旋混匀，65℃振荡水浴 30min;
7. 加 5μl RNase A，摇晃数次，放置室温 10min;
8. (选做) 10,000xg 离心 5min，小心吸取上清液到已灭菌的离心管中;
9. 加 220μl Buffer YDL 和 220μl 无水乙醇，最大速度涡旋混匀 20s;
10. 将 HiBind® DNA Mini Column 套在新的 2mL 收集管中，转移步骤 9 中的混合液到 HiBind® DNA Mini Column 中，10,000xg 离心 1min，弃滤液;
11. 将 HiBind® DNA Mini Column 套在新的 2mL 收集管中，加入 500μl Buffer HB 洗涤。10,000xg 离心 1min，弃滤液;
12. 将 HiBind® DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中，加入 700μl DNA Wash Buffer 洗涤，10,000xg 离心 1min，弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 重复步骤 12;
14. 将 HiBind® DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 ($\geq 10,000\times g$) 空甩离心 2min, 干燥柱子;
15. 将 HiBind® DNA Mini Column 套入到新的无核酸酶的 1.5mL 离心管, 加入 50-100 μ l 65°C预热的 Elution Buffer, 在室温下静置 3-5min;
16. 10,000 $\times g$ 离心 1min 洗脱;
17. 再用 50-100 μ l 65°C的 Elution Buffer 洗脱一次。

Note: 每 50-100 μ l 洗脱, 产量为柱子的 60%-70%,两次洗脱可以达到 90%,然而增加了洗脱体积降低了浓度。可以在洗脱前放在 70°C水浴提高溶解, 3mL 的酵母培养液可以提取 15-30 μ g 的 DNA, 具体取决于来源, 生长期等。

酵母样品真空/旋转 DNA 操作方案

注意: 开始前请阅读使用说明书和真空设备操作说明

1. 按前面的标准方案处理酵母样品。
2. 按使用说明将 V-spin 离心柱连接到真空抽滤盒上。
3. 将 DNA/YDL/乙醇混合物加入到柱子中。
4. 打开真空开关使溶液通过柱子, 关闭开关。
5. 加入 500 μ l Buffer HB 到柱子中, 打开真空开关使溶液通过柱子, 关闭开关。
6. 加入 700 μ l DNA Wash Buffer 到柱子中, 打开真空开关使溶液通过柱子, 关闭开关。重复此步骤一次。
7. 将柱子从真空抽滤盒上取出并套入到一个 2mL 收集管上, 在微量离心机上最大速度 ($\geq 10,000\times g$) 离心 2min 以干燥柱子。
8. 将柱子套在一个新的 1.5mL 离心管中, 加入 30-50 μ l Elution Buffer, 静置 1-2min, 离心 1min 洗脱 DNA。

产量与质量的测定

DNA 的产量可由分光光度计检测, 用去离子水、Tris-HCl 或 DNA Elution Buffer 作空白对照。DNA 浓度可按以下公式计算:

$$[\text{DNA}] = (A_{260}) \times (0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{稀释倍数}$$

DNA 的质量可通过比较在 260nm 和 280nm 处的吸光度估计得到。 A_{260}/A_{280} 的比率在 1.7-1.9, 就相当于 85-95%的纯度。

每 3mL 酵母培养液预期的 DNA 产量为 15-30 μ g, 具体产量与样品来源、生长期有关, 提取后的 DNA 保存在-20°C。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准