

版本号: 241030

## Bacteria genomic DNA Maxi Kit

### 大量细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: DN49

#### ❖ 适用范围:

适用于大量细菌基因组DNA提取。

#### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10次(DN4901)
平衡液	室温	10 ml
缓冲液 RB	室温	120 ml
结合液 CB	室温	40 ml
去蛋白液 PE	室温	64 ml 第一次使用前按照瓶子标签加入无水乙醇
漂洗液 WB	室温	50 ml 第一次使用前按照瓶子标签加入无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
蛋白酶 K 溶液	4°C	1ml × 4
吸附柱 XC	室温	10 个
收集管 (2ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

#### 储存事项:

1. 结合液 CB、或者去蛋白液 PE 低温时可能出现析出和沉淀, 可以在 37°C 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。
2. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输。收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, -20°C 保存 2 年。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## ❖ 产品介绍：

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞，利用硅胶膜离心柱特异地吸附 DNA，无需酚氯仿等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，最大限度的去除蛋白及其他抑制性杂质。适用于从多种细菌中高效地提取基因组 DNA。提取的 DNA 可直接用于酶切、PCR、Southern Blot 等实验。

## ❖ 产品特点：

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要耗时的乙醇沉淀等。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30 kb-50 kb，可直接用于 PCR、Southern-blot 和各种酶切反应。

## ❖ 注意事项：

1. **所有的离心均在室温完成**，使用转速可达到 9,000 rpm 的 50 ml 转头离心机。
2. 需要自备乙醇，异丙醇，RNase A（可选）。
3. 需自备 0.5M EDTA、Triton X-100 和 Lysozyme（溶菌酶）（用于革兰氏阳性菌）。
4. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37°C 或 70°C 备用。

## ❖ 关于平衡液的使用

1. 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。
2. **使用方法：（临用前才预处理）**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 1 ml 的平衡液至柱子中。8,000 ×g（约 9,000 rpm）离心 2 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

## ❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇒ 第一次使用前按照漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶子标签指示加入无水乙醇充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 取 40–60 ml 培养菌液， $8,000 \times g$ （约 9,000 rpm），离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

▲起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整，但是离心吸附柱最大吸附能力是 1 mg 基因组 DNA，如果菌体过量超过最大吸附能力，反而会严重降低产量。

2. 加入 8 ml 缓冲液 RB 重悬， $8,000 \times g$ （约 9,000 rpm），离心 1 min，弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 3.6 ml 缓冲液 RB 中。

▲注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过步骤 2，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入 3.6 ml 缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为 20 mg/ml 的溶菌酶(溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制，否则会导致溶菌酶无活性))，37°C 处理 30 min 以上。

3. 加入 380  $\mu$ l 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入 4 ml 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在 70°C 放置 10 min。

可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 4 ml 结合液 CB 前加 100  $\mu$ l RNase A (100 mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 15–20 min。

### 平衡液预处理吸附柱备用：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为可选做步骤，时间较长的试剂盒可以做此处理。具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

4. 冷却后加入 2 ml 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。分多次转移混合液至吸附柱中， $8,000 \times g$  离心 1 min，弃滤液。

▲上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 30 sec 混匀。

▲个别情况下离心机转子倾角较大，建议每次加入吸附柱的溶液体积为 10 ml（不超过，以防产生漏液现象）。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

5. 加入 10 ml 去蛋白液 PE（请先检查是否已加入无水乙醇！）， $8,000 \times g$ （约 9,000 rpm），离心 1 min，弃废液。

6. 加入 10 ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 8,000 ×g (约 9,000 rpm), 离心 1 min, 弃废液。
7. 重复步骤 6 一遍。
8. 将空吸附柱放回收集管中, 8,000 ×g 离心 3 min 以上干燥基质膜上残留乙醇, 尽量除去漂洗液, 该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇, 残留乙醇抑制下游反应并降低洗脱效率, 降低质粒产量。
9. 将吸附柱置于新的 50 ml 离心管中, 室温晾干 2-3 min, 在吸附膜的中间部位加 1 ml-2 ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-75°C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 2 min, 8,000 ×g 离心 1 min, 弃吸附柱。  
▲推荐: 为了增加 DNA 的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 1 min, 8,000 ×g 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。  
▲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 600 μl, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
10. DNA 可以存放在-20°C, 如果要长时间存放, 可以放置在-70°C。