

版本号: 241219

Bacteria genomic DNA Kit
细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: DN11

❖ **适用范围:**

适用于细菌基因组DNA提取。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次 (DN1101)	100 次 (DN1102)	200 次 (DN1103)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
裂解液 GY	室温	30 ml	60 ml	120 ml
结合液 CB	室温	11 ml	20 ml	40 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加入无水乙醇	32 ml	64 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml 第一次使用前按照瓶子标签指示加入无水乙醇	25 ml	50 ml
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	10 ml	20 ml
蛋白酶 K 溶液	4°C	1 ml	1 ml × 2	1 ml × 4
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 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 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_{260}/OD_{280} 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, 使用转速可以达到 13, 000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备异丙醇(添加异丙醇的步骤, 首选推荐使用异丙醇, 没有异丙醇也可以用乙醇替代)。RNase A (可选)。
3. Lysozyme (溶菌酶) (可选, 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。

❖ 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 0.5-2 毫升培养菌液 (最多不超过 2×10^9 个细胞), 13, 000 rpm, 离心 30 sec, 尽可能的吸弃所有上清, 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 30 μ g 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. 向菌体沉淀中加入 180 μ l 裂解液 GY，振荡或者吹打至菌体彻底悬浮。

▲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 150 μ l 裂解液 GY 振荡或者吹打至菌体彻底悬浮，加入 30 μ l 溶菌酶（50 mg/ml），混匀，37°C 处理 30 min 以上。

3. 加入 20 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml) 溶液，充分混匀，再加入 200 μ l 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 200 μ l 结合液 CB 前加 5 μ l RNase A (100 mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

4. **柱平衡：**向吸附柱 AC 中加入 100 μ l 平衡液，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

▲平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

5. 冷却后加入 100 μ l 异丙醇（也可以用无水乙醇替代），**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

▲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混匀。

6. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。

7. 加入 500 μ l 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。

8. 加入 600 μ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。

9. 重复步骤 8 一遍。

10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 80-100°C 水浴中预热可以提高产

量), 室温放置 2-4 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。

▲可将第一次洗脱所得溶液重新加入离心柱中, 室温放置 2 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。可以提高浓度 10%左右。

▲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 30 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。

12. DNA 可以存放在-20°C, 如果要长时间存放, 可以放置在-70°C。