

细菌基因组 DNA 提取试剂盒

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (DP2001)	100 次 (DP2002)	200 次 (DP2003)
缓冲液 SL	室温	10 ml	20 ml	40 ml
结合液 SB	室温	10 ml	20 ml	40 ml
漂洗液 PW	室温	15 ml	15mlX2	15mlX4
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	20 ml	40 ml
蛋白酶 K (20mg/ml) (仅 II 型提供)	-20℃	20mg 冻干粉	20mgX2 冻干粉	20mg X4 冻干粉
吸附柱	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。

注意事项

- 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 PW 中加入 60ml 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！
- 结合液 SB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 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。
- 为避免降低活性，方便运输，提供蛋白酶 K 为冻干粉状，收到后，可短暂离心后，加入 1 毫升灭菌水溶解，因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量 (20 微升) 分装冻存，-20℃ 保存。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

二、原理简介

本试剂盒用于快速从各种细菌中提取基因组 DNA。细菌样品加入细胞核裂解液(或者通过溶菌酶或者其他一些酶帮助裂解细胞壁后)，首先在强去污剂作用下裂解细胞释放出基因组 DNA，接着加入 RNase A 去除 RNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后通过异丙醇沉淀得到细菌基因组 DNA

三、试剂盒特点

- 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂。
- 快速，简捷，细菌样品操作整个过程可在 1 个小时内完成。
- 结果稳定，产量高 (比离心柱型的产量高一倍以上)，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 50Kb-150kb，可直接用于 PCR，Southern-blot，文库构建和各种酶切反应。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分！)

- 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 用户需自备异丙醇、70% 乙醇、0.5mol EDTA 和 Lysozyme (用于革兰氏阳性菌)、lysostaphin (用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)、水浴箱。
- 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。

4. 本试剂盒为溶液型，可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的细菌细胞量，请联系我们索取其它处理量的操作手册。

五、操作步骤

1. 收集 1 毫升过夜培养细菌加入 1.5 毫升离心管。
2. 12,000rpm 离心 30 秒,使细胞沉淀下来,弃上清,涡旋或轻弹打散细胞沉淀。对革兰氏阳性菌,接步骤 3。对革兰氏阴性菌,接步骤 6。
3. 加入 480 μ l 50mM EDTA 完全重悬细胞。
4. 加入 120 μ l 溶菌酶(10mg/ml),混匀。
对于大部分的革兰氏阳性菌如 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, 和 *Brevibacterium albidum* 使用溶菌酶就可以有效裂解。但是对于某些种类的 *Staphylococcus*, 则应该加入 60 μ l 溶菌酶 (10mg/ml) 和 60 μ l *lysostaphin* (10mg/ml) 确保有效裂解。
5. 37°C 温育 30–60 分钟。12,000rpm 离心 2 分钟,弃上清。
6. 加入 600 μ l 细胞核裂解液至打散的细胞,轻柔吹打裂解细胞。
7. 80°C 温育 5 分钟裂解细胞,然后冷却至室温。
8. 加入 RNase A (10mg/ml) 1.8 μ l 至裂解物中至终浓度 30 μ g/ml。颠倒混匀后 37°C 温育 15–60 分钟去除残留 RNA。然后室温冷却至少 5 分钟使回复到室温。
9. 在回复到室温的裂解物内加入 200 μ l 蛋白沉淀液后,在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴 5 分钟。
由于样品体积重量小,用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA,如果用手振荡混匀,则不可以用手上下剧烈振荡混匀,只能适当力度振荡混匀,否则会剪断基因组 DNA,但是力度也不能小,要保证充分混匀,将粘稠的裂解物打散开,否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开, 离心的时候会 和蛋白质一起沉淀下来,造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分,最后的产物污染有大量的蛋白质。因此建议新手还是用涡旋振荡器。
10. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底白色的蛋白沉淀,也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。
11. 小心吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管中。
吸取上清时小心不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀,如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中,可再次离心 2 分钟后取上清。
12. 加入等体积的异丙醇(约 600 μ l),轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现絮状(丝状)白色 DNA 沉淀。
13. 加入 1ml 70%乙醇后,颠倒漂洗 DNA 沉淀,12,000rpm 离心 1 分钟,在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块,倒弃上清。
14. 加入 0.5ml 70%乙醇,颠倒几次漂洗 DNA 沉淀,12,000rpm 离心 1 分钟,倒去上清(注意不要把 DNA 沉淀倒掉了),倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇,还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇,空气晾干沉淀几分钟。
注意不要干燥过头,否则 DNA 极其难溶,也不能残留太多乙醇,否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。
15. 加入 100 μ l DNA 溶解液重新溶解 DNA 沉淀,轻弹管壁混匀,可以放置在 65°C 温育 30–60 分钟(不要超过一小时),中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4°C 放置过夜来重新水化 DNA,中间不时颠倒轻弹帮助溶解。

16. DNA 可以存放在 2-8℃, 如果要长时间存放, 可以放置在-20℃。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA产量低	使用了不恰当的裂解液, 造成裂解不完全	处理材料不要过量。
	有的革兰氏阳性菌裂解比较困难	按照步骤 4 使用 lysostaphin 帮助裂解
	加入蛋白沉淀液后没有充分混匀, DNA 和蛋白质沉淀不能分离开, 离心时丢失	参见步骤 9 保证充分混匀
	DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了	异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中, 倒弃上清的时候要格外小心, 不要把 DNA 沉淀也倒掉了。
A260/A280>1.9	RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染	可以加大 RNA 酶用量或者处理时间延长到 1 小时。
	DNA 剪切断了	严格按照操作步骤, 动作不可以太剧烈。
A260/A280 <1.6	蛋白质残留高	保证重复的裂解液用量和时间; 看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的解决方法, 确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 11, 防止蛋白污染。
	测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280	使用 TE 缓冲液来稀释 DNA, 保证 PH 值大于 8.0。
	DNA 没有完全溶解	可在 65℃ 温育帮助重新溶解 (不要超过一小时) 然后室温或者 4℃ 放置过夜, 期间可以颠倒轻弹帮助溶解。