

GF-1 细菌 DNA 提取试剂盒说明书

版本 2.1

产品简介:

GF-1 细菌 DNA 提取试剂盒可以快速、有效提取高达 20ug 来自于革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌的高分子量基因组 DNA。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃纤维滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合 DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，使用最佳缓冲液，以确保只有 DNA 被分离，在随后的洗涤步骤中除去细胞蛋白、代谢物、盐和其他低分子量杂质。高纯度的基因组 DNA 在水或低盐缓冲液中被洗脱，其 A260/280 比值 1.7-1.9，可用于许多常规的分子生物学应用实验，如酶切、Southern 印迹杂交、PCR、DNA 指纹分析和其他操作。

试剂盒组成成份

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-BA-025	CN/GF-BA-100	CN/GF-BA-200
组份				
GF-1 亲和柱(GF-1 columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
悬浮液 1 (缓冲液 R1) Resuspension Buffer 1 (Buffer R1)	1ml	4ml	15ml	30ml
悬浮液 2 (缓冲液 R2) Resuspension Buffer 2 (Buffer R2)	1.5ml	6ml	24ml	45ml
缓冲液 BG (Buffer BG)	4ml	14ml	56ml	100ml
洗涤液 (浓缩液) *	2.4ml	9ml	34ml	2 x 34ml
Wash Buffer(concentrate)*				
洗脱液 (Elution Buffer)	1.5ml	5ml	20ml	40ml
蛋白酶 K* (Proteinase K*)	0.11ml	0.55ml	2 x 1.05ml	4 x 1.05ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标*的请参照**配制方案**以及其**储存条件和稳定性**。

GF-1 细菌 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

注：GF-1 细菌 DNA 提取试剂盒可以从推荐的细胞培养物体积中分离高达 20ug DNA。细菌培养细胞数不尽相同，取决于菌种、生长条件以及细胞的生存能力。处理样本时，起始样本体积不要超过所推荐的体积，会导致细胞数量过多，使柱子超载，这将导致得率和纯度的降低。对于革兰氏阴性菌和阳性菌，推荐细胞培养物体积为 1-3ml，以确保获得最佳的产量和纯度。

自备材料

无水乙醇 (>95%)

溶菌酶 (50mg/ml)

RNase A (无 DNA 酶) (20mg/ml)

配制方案

贴有洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次):

在洗涤液中加入 5.6ml 无水乙醇。

CN/GF-BA-025 (25 次)

在洗涤液中加入 21ml 无水乙醇。

CN/GF-BA-100(100 次)

在洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。

CN/GF-BA-200 (200 次)

在其中一瓶洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

储存及稳定性

● 溶液 20°C-30°C 保存。

● 蛋白酶 K -20°C 保存。

● 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存 12 个月。缓冲液 BG 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

缓冲液 BG 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中来即可除去胍盐。

操作步骤

提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- 洗涤液 (浓缩液) 在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照**配制方案**。
- 如果缓冲液 BG 出现沉淀或结晶，请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。
- 预先设定 37 °C 和 65 °C 水浴锅。
- 65 °C 预热洗脱液 (可选)。

1、离心

取 1-3ml 培养生长过夜或培养生长到对数期的细菌，室温下，6,000 x g (8,500rpm) 离心 2 分钟，倒出全部上清。

注：务必去除全部上清，因为残留的培养液可能会影响得率和纯度。

2、重新悬浮沉淀

在沉淀中加入 100 μl 缓冲液 R1，上下吹打至细胞完全重新悬浮。

注：确保细胞完全悬浮。不完全悬浮易导致菌体裂解不完全。

3、溶菌酶处理

对于革兰氏阴性菌，加入 10 μl 溶菌酶 (50mg/ml) 到细胞悬浮液中。

对于革兰氏阳性菌，加入 20 μl 溶菌酶 (50mg/ml) 到细胞悬浮液中。

充分混匀，37°C 温育 20 分钟。

注：有些菌株在溶菌酶中可能需要更长的温育时间。

4、离心

被消化的细胞 10,000 x g (11,000 rpm) 离心 3 分钟，倒出全部上清。

5、蛋白质变性

在沉淀中加入 180 μ l 缓冲液R2 使细胞重新悬浮，再加入 20 μ l 蛋白酶K，充分混匀，放入摇床 65 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟，或温育过程中每 5 分钟混匀一次。

注：裂解产物在温育结束或温育 30 分钟后应变得清澈。

RNA 的去除（可选）：

如果要求 DNA 中无 RNA 存在，则加入 20 μ l RNA 酶 A（无 DNA 酶，20mg/ml），混匀并 37 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟。

注：柱子洗涤过程中，会除去残留的RNA片段。

6、均质化

加入 2 倍体积的缓冲液BG（若无RNA酶A处理，则加入 400 μ l，若经RNA酶处理，则加入 440 μ l），颠倒混匀数次，直到获得一份清亮均匀溶液。65 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。

7、加入乙醇

加入 200 μ l 无水乙醇，立即充分混匀。

注：立即混匀以防止因局部高浓度乙醇引起的任何不均匀核酸沉淀。

8、装载到亲和柱

将最大不超过 650 μ l 的上述样品转移到一个干净的带有收集管的柱子中，10,000 x g（11,000rpm）离心 1 分钟，丢弃废液。

重复操作步骤 7 中剩余样本。

注：如果柱子堵塞，加入 200 μ l 缓冲液BG，按上述方法离心。

9、柱子洗涤

加入 650 μ l 洗涤液于亲和柱中，10,000 x g（11,000rpm）离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

10、柱子干燥

10,000 x g（11,000rpm）离心柱子 1 分钟，除去残留乙醇。

注：这个步骤是为了完全除去所有残留乙醇，因为残留乙醇会影响DNA质量，还可能抑制后续的酶反应。

11、DNA洗脱

将亲和柱放入一干净的微量离心管中，取 50-100 μ l 预热洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加到亲和柱的膜中央，室温静置 2 分钟，10,000 x g（11,000 rpm）离心 1 分钟，以洗脱 DNA。

DNA 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注：确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱DNA。TE缓冲液中的EDTA可能抑制后续的酶反应，但仍可洗脱DNA。如果用水洗脱DNA，PH7.0-8.5 时洗脱效果最好。当缺乏缓冲剂时，DNA可能降解，此时DNA -20 $^{\circ}$ C 保存。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
纯度低	蛋白质变性不完全	确保在溶菌酶和蛋白酶K中温育前细胞在缓冲液R1 和 R2 中已完全重新悬浮。延长温育时间直到裂解产物变得清澈。
	RNA污染	将RNase A加入指定步骤的样品中，确保RNase A没有反复冻融。如有必要准备新的RNase A。
在缓冲液 R1 和 R2 中很难重新悬浮细胞	长时间高速离心	确保细胞培养物在推荐的速度和时间下离心。 使用移液器吸头上下吹打裂解产物直到完全均匀。
DNA没有被洗脱	洗脱液不正确	确保所用洗脱液为低盐缓冲液或pH为 7.0-8.5 的水。
在缓冲液R2 中温浴后裂解产物不清晰	溶菌酶活性可能会随时间降低	确保溶菌酶是现配制的，并且没有反复冻融。
柱子堵塞	裂解产物不清晰是由于消化或裂解不充分	确保将样品转移到柱子之前，裂解产物是清澈的。如有必要，延长在溶菌酶和蛋白酶K中的温育时间。
	柱子装量超载或样品材料过多	使用推荐的培养物体积 1-3ml。
DNA 降解或污染	纯化过程中，DNA碎裂	加入蛋白酶K后，避免剧烈混匀和吹打，应轻轻的颠倒混匀。
	核酸酶污染	使用经消毒的玻璃器皿和塑料制品并戴手套。 确保在缓冲液R2 中细胞完全悬浮。
洗脱的DNA在下游应用中性能差	洗脱下来的DNA含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	细胞悬浮不完全	确保在溶菌酶和蛋白酶 K 中温育前，细胞在缓冲液 R1 和 R2 中已完全重新悬浮。
	洗脱效果差	65 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 预热洗脱液。
	柱子堵塞	参照问题“柱子堵塞”