

细菌基因组 DNA 提取试剂盒

Bacteria Genomic DNA Kit

(溶液型)

目录号: SD07

产品内容

试剂盒组成	保存	SD07-1 10 次	SD07-2 50 次	SD07-3 100 次
Buffer A (裂解液)	室温	6 ml	30 ml	60 ml
Buffer B (蛋白去除液)	室温	2 ml	10 ml	20 ml
Buffer TE	室温	2 ml	10 ml	15ml
RNase A 干粉 (10mg/ml)	室温	30 ul	150 μ l	250 μ l

其他相关产品

目录号	名称	规格	保存	是否必备	说明
ST56	溶菌酶	20 mg	-20 °C	选配	本试剂盒 50 次需备 6 支

溶解方法: 短暂离心后, 加入 1 毫升灭菌水或 TE Buffer(pH 8.0)溶解, 溶解后请根据自己的使用情况分装成小管冻存并于 -20°C 保存, 以免反复冻融失活。

储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25 °C) 干燥条件下可保存 12 个月; 更长时间的保存可置于 2-8 °C。在 2-8 °C 保存条件下, 若产生沉淀, 使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37 °C 水浴中预热 10 min, 以溶解沉淀。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。

产品简介

本试剂盒用于快速的从各种细菌中提取基因组 DNA。细菌样品加入裂解液(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,然后蛋白去除液选择性沉淀去除蛋白,最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

产品特点

1. 不需使用有毒的苯酚
2. 操作便捷,纯度高
3. OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9,长度可达 50 kb -150kb,可直接用于构建文库,PCR, Southern-blot 和各种酶切反应
4. 本试剂盒可以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。

注意事项 (请在使用本试剂盒前务必仔细阅读此项)

1. 自备试剂:异丙醇、70%乙醇、0.5M EDTA 和溶菌酶(用于革兰氏阳性菌)、lysostaphin(用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 37°C 或 70 °C 备用
3. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA,不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱,但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率
4. 菌液的 OD 值不同,种属不同,因此提取结果可能会有差异

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. 9,000 rpm 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,直接接步骤 6。
3. 加入 480 μ l 50 mM EDTA 完全重悬细胞。
4. 加入 120 μ l 溶菌酶 (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0),混匀。
注意: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(20mg/ml)和 60 μ l lysostaphin (20mg/ml)确保有效裂解。
5. 37°C 温育 30-60 分钟。12,000 rpm 离心 2 分钟,弃上清,涡旋或轻弹打散细胞沉淀。
6. 加入 600 μ l Buffer A 至打散的细胞,轻柔吹打裂解细胞。
7. 70°C 温育 5 分钟裂解细胞,然后冷却至室温。

8. 加入 1.8 μ l RNase A (10mg/ml) 至裂解物中至终浓度 30 μ g/ml。颠倒混匀后 37 $^{\circ}$ 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 Buffer B 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。

注意：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，最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器。

10. 13,000rpm 离心 5 分钟，小心吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管中。

注意：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。

11. 加入等体积的室温异丙醇（约 600 μ l），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

注意：有时候棉絮状（丝状）DNA 颠倒混匀的时候，粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 13，直接 12,000rpm 离心 1 分钟，弃上清，然后接步骤 15。

12. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。

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（注意不要倒掉 DNA 沉淀）

15. 将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 min，确保沉淀在管中。

16. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 min）

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。但是要避免过分干燥 DNA 沉淀，因为过于干燥的 DNA 很难溶解。

17. 加入 100 μ l Buffer TE 重新溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 min（不要超过一小时），期间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA。DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	*使用了不恰当的裂解液，造成裂解不完全- 建议： 处理材料不要过量。 *有的革兰氏阳性菌裂解比较困难- 建议： 按照步骤 4 使用 lysostaphin 帮助裂解。

	<p>*加入蛋白去除液后没有充分混匀，DNA 和蛋白质沉淀不能分离开，离心时丢失-建议：参见步骤 9 保证充分混匀。</p> <p>* DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了-建议：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。</p>
A260/A280>1.9	<p>* RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染-建议：可以加大 RNA 酶用量或者处理时间延长到 1 小时。</p> <p>* DNA 剪切断了-建议：严格按照操作步骤，动作不可以太剧烈。</p>
A260/A280 <1.6	<p>*蛋白质残留高-建议：保证重复的裂解液用量和时间；看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的评论与建议，确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 10，防止蛋白污染。</p> <p>*测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-建议：使用 TE 缓冲液来稀释 DNA，保证 pH 值大于 8.0。</p> <p>* DNA 没有完全溶解-建议：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。</p>

问题	评论与建议
变色的 DNA	*如果异丙醇沉淀后没有迅速进行 70%乙醇漂洗的步骤，有的组织如肝脏提取出的 DNA 可能会变色- 建议 ：异丙醇沉淀离心后，马上进行 70%乙醇清洗的步骤。
DNA 长度小于 20kb	<p>*样品太旧或者不正确的存放，反复冻融等，造成 DNA 降解-建议：选用新鲜的样品。</p> <p>*操作不当，造成对基因组 DNA 的剪切-建议：混匀轻柔，不可以用手剧烈振荡离心管，选用大口径的枪头转移或者混匀 DNA。</p>
未见到蛋白沉淀	<p>*加入蛋白去除液前，裂解混合物没有冷却回室温-建议：冷却至室温或者冰上放置 5 分钟后再加入蛋白沉淀液。</p> <p>*蛋白去除液没有和裂解混合物充分混匀-建议：应该连续高速涡旋振荡混匀 25 秒，涡旋并不会剪切断 DNA。</p> <p>*加入蛋白去除液后，混合物没有在冰上放 5 分钟-建议：离心前在冰上放置 5 分钟帮助沉淀。</p>
DNA 沉淀难以重新溶解水化	*晾干 DNA 沉淀时过度了- 建议 ：晾干时密切观察，不要干燥过头，注意应该观察管底的 DNA 沉淀，有时候管壁上的残留乙醇已经挥发，但留下一些水分还没有干，只要管底 DNA 干了就可以加入 DNA 溶解液。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。
下游酶切不开或者 PCR 反应受抑制	* DNA 未干燥完全，残留乙醇太多- 建议 ：敞开离心管口，在 65℃温育几分钟，让乙醇挥发。