

细菌基因组 DNA 提取试剂盒

项目号: B669951

储存条件: 室温。

产品内容

组分	50T
Buffer GTL	15ml
Buffer GL	15ml
Buffer GW1 (concentrate)	13ml
Buffer GW2 (concentrate)	15ml
Buffer GE	15ml
Proteinase K	25mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25ml
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

产品简介

本试剂盒适用于从革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌中提取高纯度总 DNA，每次可处理 106-108 个细胞，获得多至 20 μ g 的总 DNA。纯化过程中不需苯酚或氯仿等有毒溶剂，无需乙醇沉淀，一小时内即可获得高纯度 DNA。本试剂盒采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他污染物可流过膜，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA。纯化得到的 DNA 可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

自备试剂：无水乙醇；提取革兰氏阳性菌需自备 Enzymatic Lysis Buffer。

Enzymatic Lysis Buffer 配制方法：20 mM Tris, pH8.0; 2 mM Na₂-EDTA, pH8.0; 1.2% Triton X-100。121℃ 灭菌处理 20 分钟，加入适量的 Lysozyme（溶菌酶）其终浓度为 20mg/ml。

实验前准备及重要注意事项

1. 向 Proteinase K 中加入 1.25ml Proteinase K Storage Buffer 使其溶解，-20℃ 保存。配制好的 Proteinase K 勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
3. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查 Buffer GTL 和 Buffer GL 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀出现，请将 Buffer GL 和 Buffer GTL 于 56℃ 水浴重新溶解。

6. 如果下游实验对 RNA 污染比较敏感,可以在加入 Buffer GL 前加入 4 μ l DNase-Free 的 RNase A(100mg/ml), RNase A 本试剂盒并未提供。

如果提取样品为革兰氏阳性菌,需客户自行配制 Enzymatic Lysis Buffer 处理菌体,其中需使用浓度为 20mg/ml 的 Lysozyme (溶菌酶), Lysozyme 本试剂盒并未提供。

操作步骤

i 革兰氏阴性菌基因组 DNA 的提取

1. 取细菌培养物 1-5ml (10⁶-10⁸ 个细胞,最多不超过 2 \times 10⁹ 个细胞)置于离心管(自备)中, 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。

2. 向沉淀中加入 180 μ l Buffer GL, 振荡使菌体重悬。

3. 加入 20 μ l Proteinase K, 涡旋混匀, 56 $^{\circ}$ C 孵育, 直至溶液变清亮, 孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

注意: 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。

4. 加入 200 μ l Buffer GL, 涡旋震荡充分混匀。加 200 μ l 无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。

短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。

注意: 1) 如果多个样品一起操作, Buffer GL 和无水乙醇可以等比例混匀后一起加入, 震荡混匀。

2) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

5. 将步骤 4 所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

7. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

注意: 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复步骤 7。

8. 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇残留会影响后续酶促反应(酶切、PCR 等)。

9. 将吸附柱置于一个新的离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 50-200 μ l Buffer GE, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。注意: 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量。

3) 用另外的 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可以将步骤 9 所得的 DNA 洗脱液重新加至吸附膜上, 重复步骤 9; 若洗脱体积小于 200 μ l, 可以增加 DNA 的终浓度, 但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μ g, 推荐用 50 μ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。

5) 保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用影响, 如需长期保存, 推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

ii 革兰氏阳性菌基因组 DNA 的提取

1. 取细菌培养物 1-5ml (10⁶-10⁸ 个细胞,最多不超过 2 \times 10⁹ 个细胞)置于离心管(自备)中, 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。

2. 加入 180 μ l Enzymatic Lysis Buffer (自备)使菌体重悬。

Enzymatic Lysis Buffer 配制方法见说明书前部分自备试剂。

3. 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

4. 加入 20 μ l Proteinase K 涡旋震荡, 充分混匀。加入 200 μ l Buffer GL, 涡旋震荡混匀。

注意: 不要把 Proteinase K 直接加到 Buffer GL 中。

5. 56°C 孵育 30 分钟。

注意：1) 如果需要，95° C 孵育 15 分钟可以使病原体失活，但是 95° C 孵育会造成一些 DNA 的降解。

2) 如需去除 RNA，可在上述步骤完成后，加入 4 μl 浓度为 100mg/ml 的 RNase A 溶液，震荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

6. 加入 200 μl 无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

注意：加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

7. 将步骤 6 所得溶液（包括形成的沉淀）全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM），若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：如需进一步提高 DNA 纯度，可重复步骤 9。

10. 12,000 rpm 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟彻底晾干。

注意：这一步目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应（酶切、PCR 等）。

11. 将吸附柱置于一个新离心管（自备）中，向吸附柱中间部位悬空加入 50-200 μl Buffer GE，室温放置 2-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，-20°C 保存 DNA。

注意：1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量。

3) 用另外的 50-200 μl Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高 DNA 的终浓度，可以将步骤 11 所得的 DNA 洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤 11；若洗脱体积小于 200 μl，可以增加 DNA 的终浓度，但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μg，推荐用 50 μl Buffer GE 或灭菌水洗脱。

5) 保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用影响，如需长期保存，推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20°C 保存。