



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.
Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 细菌基因组DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1411
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 1411

目录编号	包装单位
141101	50次
141102	100次
141103	200次
141111	50次(带蛋白酶K)
141112	100次(带蛋白酶K)
141113	200次(带蛋白酶K)

❖ **适用范围:**

适用于快速提取各种细菌基因组DNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
缓冲液 RB	室温	30 ml	60ml	120 ml
结合液 CB	室温	11 ml	20 ml	40ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25 ml	2x25 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml	40 ml
蛋白酶 K 粉 (可选) 20mg/ml	-20℃	20mg	2×20mg	4×20mg
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 或者抑制物去除液 IR 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。
2. 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。
3. 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。

❖ **产品介绍:**

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
 2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
 3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
 4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30kb-50kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。
-



❖ **注意事项：**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前根据需要将水浴预热到 37℃或者 70℃备用。
3. 需要自备异丙醇。
4. 需自备0.5M EDTA和Lysozyme（溶菌酶）（用于革兰氏阳性菌）、lysothaphin(用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)。
5. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
6. 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，但应该确保批 pH 大于 7.5， pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在-20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用TE 缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。





❖ **操作步骤:** (实验前请先阅读注意事项)

提示: 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇, 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), 10,000rpm, 离心 30 秒, 尽可能的吸弃上清, 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 20 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. 加入 200 μ l 缓冲液 RB 重悬, 10,000rpm 离心 30 秒, 弃上清。将细胞振荡或者吹打重悬于 180 μ l 缓冲液 RB (革兰氏阴性菌) 或者 480 μ l 50mM Na₂EDTA (PH 8.0) (革兰氏阳性菌)。

3. **对于革兰氏阴性菌(可选做此步骤):**加入 5 μ l 溶菌酶(20mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

对于革兰氏阳性菌:加入 120 μ l 溶菌酶 (20mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟。12,000rpm 离心 2 分钟, 弃上清后将细胞振荡或者吹打重悬于 180 μ l 缓冲液 RB 中。

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。

4. 加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/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 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。

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 20 μ l RNase A(25mg/ml) 溶液, 振荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。





5. 冷却后加入 100 μ l 异丙醇，**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 15 秒混匀。
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 秒，倒掉收集管中的废液。
7. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。
8. 加入 700 μ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，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 100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好），室温放置 3-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
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 50 μ l，体积小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
12. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C,如果要长时间存放，可以放置在一20 $^{\circ}$ C。





❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*蛋白酶 K 失效了-建议: 收到蛋白酶 K 后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-建议: 加入结合液后, 和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀; 加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱, 如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。</p> <p>*有的革兰氏阳性菌需要特殊的酶裂解-建议: 请详细参见步骤 3, 了解提取细菌的特性</p>
未提取到 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议: 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</p>
洗脱下来的 DNA 产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议: 确保做了步骤 10, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议: 仔细阅读仔细阅读注意事项 6 和步骤 11 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。</p>
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值-建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应-建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p> <p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-建议: 确保做了步骤 10, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。</p>

