



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

- ◆ 中量/大量细菌基因组DNA提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1413
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

中量/大量细菌基因组 DNA 提取试剂盒

目录号: 1413

| 目录编号 | 包装单位 |
|--------|------|
| 141301 | 20次 |
| 141302 | 50次 |

❖ **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 | 20 次 | 50 次 |
|------------------|------|--------|---------|
| 细胞核裂解液 | 室温 | 90ml×2 | 250ml×2 |
| 蛋白沉淀液 | 室温 | 60ml | 150ml |
| DNA 溶解液 | 室温 | 10ml | 20ml |
| RNase A(10mg/ml) | -20℃ | 500µl | 1ml |

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。



储存事项:

1. **环境温度低时**细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出**出现浑浊或者沉淀**，可在 37℃ 水浴加热几分钟，轻轻旋摇，即可恢复澄清，**不要剧烈摇晃**，以免形成过量的泡沫。
2. 蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 水浴几分钟帮助重新溶解，**如果不能完全溶解，也不影响使用效果**，直接取用上层溶液即可。
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:

本试剂盒用于快速的从各种细菌中提取基因组 DNA。细菌样品加入细胞核裂解液(或者通过溶菌酶或者其它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:

- ❖ 不需要使用有毒的苯酚等试剂。
- ❖ 快速,简捷,单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
- ❖ 结果稳定,产量高,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。

❖ 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 3,000xg,可容纳 50ml 离心管的台式离心机。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、0.5M EDTA 和 Lysozyme (溶菌酶)(用于革兰氏阳性菌)、lysozymin(用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)、水浴箱。
3. 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。



❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

1. 收集 10 毫升过夜培养细菌加入 15 毫升离心管。
2. 2,000xg 离心 3 分钟，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 4.8ml 50mM EDTA (PH 8.0) 完全重悬细胞。

4. 加入 1.2ml 溶菌酶(20mg/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(20mg/ml)和 60 μ l lysostaphin (20mg/ml)确保有效裂解。

5. 37 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟。2,000xg 离心 10 分钟，弃上清，吹打涡旋打散细胞沉淀。

6. 加入 9ml 细胞核裂解液至打散的细胞，轻柔吹打裂解细胞。

7. 80 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟裂解细胞，然后冷却至室温。

8. 加入 18 μ l RNase A (10mg/ml) 至裂解物中至终浓度 20 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 分钟使恢复到室温。

9. 在恢复到室温的裂解物内加入 3ml 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。因此建议用涡旋振荡器。

-
10. 5,000xg(可根据需要调整加大离心力)离心 10 分钟。这时应该可以见到管底蛋白沉淀，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 50ml 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 5 分钟后取上清。
12. 加入等体积的室温异丙醇((约 9ml), 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 2,000xg 离心 5 分钟，弃上清，然后接步骤 15。
13. 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。
14. 加入 9ml 70%乙醇后，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 离心 3-5 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。
15. 加入 5ml 70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 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。
16. 加入 500 μ l DNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA，中间不时颠倒轻弹帮助溶解。
17. 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。 |
| | * 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- 建议 ：参见步骤 9 保证充分混匀。 * 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。 |
| A260/A280>1.9 | * 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。 |
| | * DNA 剪切断了- 建议 ：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- 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 11，防止蛋白污染。 |
| | * 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。 |
| | * 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。 |

| 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 | *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。 *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。 |
| 未见到蛋白沉淀 | *加入蛋白沉淀液前, 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。 *蛋白沉淀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。 *加入蛋白沉淀液后, 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。 |
| 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。 |