

科研使用

细菌基因组 DNA 提取试剂盒

（离心柱法+锆 beads）说明书

Bacteria Genomic DNA Extraction Kit

目录

● 制品说明.....	1
● 制品内容（50 次量）	1
● 保存与运输.....	2
● 实验前的准备.....	2
● 操作方法.....	2
● 实验例.....	3
● 注意事项.....	5

◆ 制品说明

本试剂盒是专门用于提取各种革兰氏阳性/阴性细菌（Gram-positive/negative Bacteria）基因组 DNA 的小量纯化试剂盒。试剂盒采用了溶菌酶以及独特的细胞裂解系统，由细胞裂解液裂解细胞释放基因组 DNA，再利用硅胶膜离心柱特异地吸附 DNA，从而达到纯化基因组 DNA 的目的，适用于革兰氏阴性菌及绝大部分革兰氏阳性菌。本试剂盒具有高效、快速、方便的特点，组织细胞裂解后，提取操作仅需 15 分钟便可完成。本试剂盒提取得到的基因组 DNA 纯度高，可直接用于 PCR 反应、Southern 杂交以及酶切等分子生物学实验。

◆ 制品内容（50 次量）

本试剂盒分 Part 1 和 Part 2 两部分

Part 1 部分（请于-20℃保存）

Proteinase K（20 mg/mL）	1 mL
溶菌酶（50 mg/mL）*1	1 mL × 4
RNase A（10 mg/mL）	100 μL

*1 溶解后应尽量避免反复冻融，溶解后未使用部分应置于-20℃保存。

Part 2 部分（请于室温 15~25℃保存）

制备柱	50 个
2mL 收集管	50 个
1.5mL 收集管	50 个
RS	10 mL
铅 beads	15g
AVL*1	25 mL
洗液 1*2	24 mL
洗液 2*2	8 mL
Elution Buffer	10 mL
溶菌酶稀释液	10 mL

*1 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即用大量清水冲洗后到医院进行处理。

*2 首次使用前，请参照试剂瓶上标签加入一定体积的无水乙醇，混合均匀后再使用。

【试剂盒之外所需准备试剂】

无水乙醇

◆ 保存与运输

1. 本试剂盒分三部分保存，Part1 请于-20℃保存，Part2 于室温（15-25℃）保存，其中溶液 RS 中加入 RNase A 后，请于 2-8℃保存；
2. 本试剂盒分两部分运输，Part1 请于-20℃条件下运输，Part2 于室温下（15-25℃）运输。

◆ 实验前的准备

1. 准备 37℃（提取革兰氏阳性菌时需要）、56℃水浴；
2. 配制 50 mg/mL 溶菌酶溶液：将装有溶菌酶干粉的冻存管 12000 rpm 离心 1 min 后，加入 1 mL Elution Buffer，涡旋混匀备用（未用完的溶菌酶溶液需保存在-20℃，建议避免反复冻融），若有泡沫轻弹管壁可减少泡沫；
3. 配制溶菌酶缓冲液：取干净的离心管，将溶菌酶稀释液和 50 mg/mL 溶菌酶溶液按 110:70 的比例混匀（现配现用）；
4. 将 100 μL RNase A 全部加入溶液 RS 中，混匀后使用或置于 2-8℃保存；
5. AVL 若出现沉淀，请于 65℃加热溶解，待恢复至室温后使用；
6. 洗液 1 和洗液 2 在首次使用前，请参照试剂瓶上标签加入一定体积的无水乙醇，混合均匀后再使用；
7. 洗脱结合于离心柱硅胶膜上的基因组 DNA 时，将 Elution Buffer 加热至 65℃使用将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

◆ 操作方法

操作流程见图 1，分为菌体裂解、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，菌体裂解后操作约需 15 min，详细说明如下：

1. 12,000 rpm 离心 1 min，收集 0.5~5mL 菌液（根据细菌浓度而定），倒弃培养基；

革兰氏阳性菌处理：加入 180 μL 溶菌酶缓冲液（110 μL 溶菌酶稀释液+70 μL 50 mg/mL 溶菌酶溶液），37℃震荡孵育 30min~1 h（水浴锅孵育需每隔 5 min 颠倒混匀一次），12,000 rpm 离心 5 min，弃上清；

2. 加入 180 μL RS、40mg 钨 beads、20 μL Proteinase K（20 mg/mL），涡旋震荡 5min，混匀后于 56℃水浴孵育 10 min

3. 加入 350 μL AVL, 颠倒混匀 5~6 次, 室温静置 5 min;
4. 加入 350 μL 无水乙醇, 颠倒混匀 6~8 次
5. 将离心柱安装在收集管中, 短暂离心后将溶液全部转移至离心柱, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
6. 将 600 μL 洗液 1 加入至离心柱中 (使用前检查是否已加入对应体积无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
7. 将 600 μL 洗液 2 加入至离心柱中 (使用前检查是否已加入对应体积无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
8. 12,000 rpm 离心 2 min, 确保去除多余的乙醇;
9. 将离心柱转移至新的离心管中, 在离心柱硅胶膜的中央处加入 50~200 μL 的 Elution Buffer, 室温静置 2 min (将 Elution Buffer 加热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱效果更好);
10. 12,000 rpm 离心 2 min (如需获得更大收量, 可将离心下来的液体重新加入到离心柱硅胶膜的中央或再加入 50~200 μL 的 Elution Buffer, 室温静置 2 min 后 12,000 rpm 离心 2 min);
11. 将离心柱取出丢弃, 盖上离心管盖子, 即为提取得到的细菌基因组 DNA。

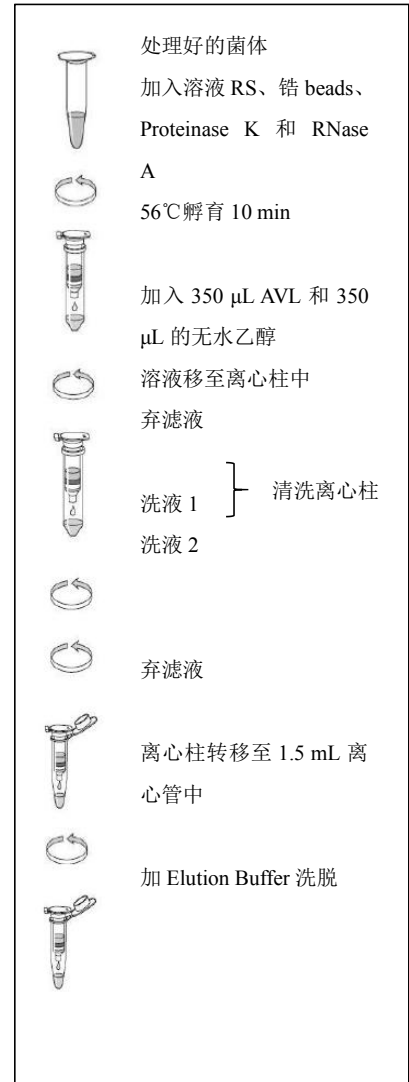


图 1 操作流程简图

◆ 实验例

1. 从革兰氏阳性菌中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从革兰氏阳性菌中提取基因组 DNA, 最终分别从白色念珠菌、金黄色葡萄球菌中纯化得到了高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 2。

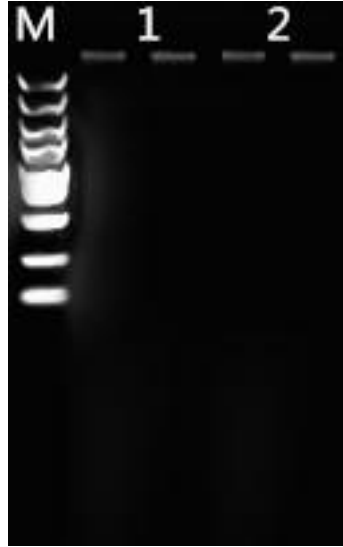


图 2 从革兰氏阳性菌中提取的基因组 DNA

注：2%琼脂糖凝胶电泳图；M：DL 5000 Maker（TaKaRa）；1.白色念珠菌基因组 DNA；
2.金黄色葡萄球菌基因组 DNA

2.从革兰氏阴性菌中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从革兰氏阴性菌中提取基因组 DNA，最终分别从大肠杆菌、肺炎克雷伯菌中纯化得到了高纯度基因组 DNA，其电泳结果见图 3。

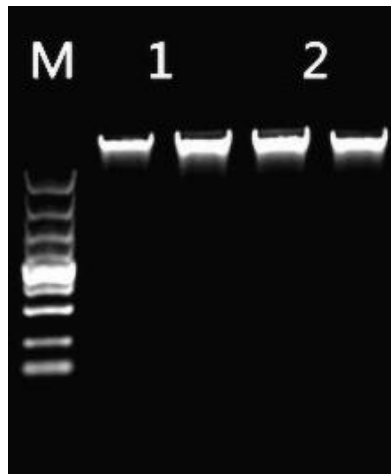


图 3 从革兰氏阴性菌中提取的基因组 DNA

注：2%琼脂糖凝胶电泳图；M：DL 5000 Maker（TaKaRa）；1.大肠杆菌基因组 DNA；2.肺炎克雷伯菌基因组 DNA

◆ 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的菌体，以确保提取的基因组 DNA 的收量及完整性。
2. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时应寻求医疗咨询。
3. 若基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 溶出，并置于 -20 °C 保存。
4. 菌体起始量不要过多，若细菌经过过夜培养，则取 0.1~1 mL 菌液收集菌体即可。