

## 细菌基因组DNA快速提取试剂盒

货号：DD107-01

规格：50次

保存：15-25 °C

### 【产品概述】

本产品独特的结合液/蛋白酶K迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，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，在低盐洗脱缓冲液作用下得到纯净的基因组DNA。

### 【产品组分】

货号	组分	体积
DD107-101	平衡液	5 ml
DD107-102	缓冲液RB	30 ml
DD107-103	结合液CB	11 ml
DD107-104	抑制物去除液IR	25 ml
DD107-105	漂洗液WB（首次使用前按说明加指定量无水乙醇）	13 ml
DD107-106	洗脱缓冲液EB	15 ml
DD107-107	蛋白酶K溶液（可选）20mg/ml	1 ml
DD107-108	吸附柱&收集管（2ml）	50套

### 【保存条件】

室温（15-25°C）保存，保质期一年。

注意事项：

- （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，在37°C水浴几分钟重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- （2）蛋白酶K保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输，收到后，不超过25°C室温至少保存6个月，4°C保存12个月，-20°C保存2年。

### 【产品特点】

1. 本产品不需要使用苯酚，不需要乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作30分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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。

### 【实验准备】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的台式离心机。
2. 需要自备异丙醇、0.5M EDTA、Triton X-100和Lysozyme（溶菌酶）（用于革兰氏阳性菌）。
3. 实验前将水浴先预热到37°C或者70°C备用。
4. 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。
5. 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°C。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】

**提示：**（1）首次使用前请在漂洗液WB中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标注，以免重复。

（2）平衡液预处理吸附柱备用：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取100  $\mu$ l的平衡液至柱子中。13000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。

1. 取0.5ml-2ml培养菌液（最多不超过 $2 \times 10^9$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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充分重悬于180  $\mu$ l缓冲液RB中。

**注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过第2步骤，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入180  $\mu$ l缓冲液（20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为20 mg/ml的溶菌酶（溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制，否则会导致溶菌酶无活性）），37  $^{\circ}$ C处理30 min以上。**

3. 加入20  $\mu$ l蛋白酶K（20mg/ml）溶液，充分混匀，再加入200  $\mu$ l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在70 $^{\circ}$ C放置10分钟。

*可选步骤：如果RNA残留较多，需要去除RNA，可以在加入200  $\mu$ l结合液CB前加20  $\mu$ l RNase A (25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。*

4. 待冷却后加入100  $\mu$ 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。

此步骤中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。

5. 将以上混合物（包括可能有的沉淀）加入吸附柱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。

6. 加入500  $\mu$ l抑制物去除液IR，12,000 rpm离心30秒，弃废液。

7. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB（请确保已加入无水乙醇），12,000 rpm离心30秒，弃掉废液。

8. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB，12,000 rpm离心30秒，弃掉废液。

9. 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。

10. 取出吸附柱AC，放入干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加100  $\mu$ l洗脱缓冲液EB（洗脱缓冲液在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。

**注：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30  $\mu$ l，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。**

11. DNA可以存放在2-8 $^{\circ}$ C，-20 $^{\circ}$ C可以长期保存。

## 【常见问题分析及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
DNA产量低	蛋白酶K失效	收到蛋白酶K后，按照每次使用量分装保存，避免反复冻融。
	裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀	加入结合液和入蛋白酶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再加入吸附柱，如果太粘稠须涡旋振荡15秒充分混匀。
	有的革兰氏阳性菌需要特殊的酶裂解	请详细参见步骤3，了解提取细菌的特性
洗脱所得DNA产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇	确保做了步骤9，否则残留乙醇会影响洗脱效率。
	使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液	仔细阅读仔细阅读注意事项6和步骤10和只使用洗脱缓冲液EB洗脱。
A <sub>260</sub> 吸光值偏高	硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	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。
DNA下游酶切不能切开或者酶切不完全	硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应	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。
	离心柱残留有较多乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

## 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。