

# 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 (硅胶膜离心柱法)

## 产品组分

组分	N1151	N1152
消化缓冲液 DS	15 ml	30 ml
裂解液 MS	20 ml	40 ml
蛋白酶 K	1 ml	2 ml
去蛋白液 PS	30 ml	60 ml
漂洗液 PE	15 ml	30 ml
纯化液 TE	5 ml	10 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

- 裂解液 MS 中含变性剂, 请不要直接接触皮肤。
- 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:3 稀释, 即含 75%乙醇。

## 产品说明

本产品用于细菌基因组 DNA 的小量提取。其纯化原理是利用细胞裂解液裂解细胞释放基因组 DNA, 由硅胶膜柱可逆吸附基因组 DNA, 经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质等杂质后, 用纯化液洗脱获得基因组 DNA。本产品可从 0.5-2 ml 对数生长期的菌液 (不超过  $10^6$ - $10^8$  个) 中提取到 3-20 $\mu$ g 超纯基因组 DNA ( $OD_{260/280} = 1.7$ - $1.9$ ), 此基因组 DNA 可直接用于酶切、PCR 等后续实验。

## 质量控制

纯化的基因组 DNA 质量通过限制性酶切和单拷贝基因的 PCR 扩增鉴定。

## 保存条件

蛋白酶 K 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

其余试剂置于室温 ( $15$ - $25^{\circ}\text{C}$ ) 干燥条件下保存 1 年。

如果消化缓冲液 DS 和 MS 中有沉淀, 可在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 的纯化效率。

## 注意事项

- 漂洗液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入 3 倍体积的无水乙醇, 即 15 ml 漂洗液 PE 加入 45 ml 无水乙醇, 30 ml 漂洗液 PE 加入 90 ml 无水乙醇, 使用后立即盖紧盖子。
- 消化缓冲液 DS 和裂解液 MS 室温保存可能会有沉淀产生, 在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 纯化效率。
- 应尽量使用新鲜的菌体, 确保提取的基因组 DNA 不被降解。
- 在操作步骤 4 中, 菌体应充分悬浮, 不要残留菌块, 避免影响溶菌效果。
- 在操作步骤 5 中, 加入无水乙醇后, 可能会出现絮状沉淀, 应将离心管内的溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中, 确保基因组 DNA 的得率。
- 基因组 DNA 需长期保存时, 建议使用纯化液 TE。用无菌的离心管分装后保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$ 。
- 所有离心步骤均为室温下进行。
- 请严格按照操作步骤操作。

**操作步骤**

- 1 取 0.5-2 ml 处于对数生长期菌液，置于 1.5 ml 离心管中。12,000 rpm 离心 1min，弃上清。
- 2 向收集到的菌体沉淀中加入 200  $\mu$ l 缓冲液 DS，用漩涡振荡器剧烈振荡直至菌体彻底悬浮。
  - 对于较难破壁的革兰氏阳性菌，需加入溶菌酶消化细胞壁后，再进行基因组 DNA 的提取。具体方法为：向步骤 1 收集到的菌体中，加入 180  $\mu$ l 缓冲液（20 mM Tris, pH8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton100）和终浓度为 20 mg/ml 的溶菌酶（东盛货号：N9021），振荡混匀。37 $^{\circ}$ C 处理 30min 以上。
  - 如需要去除 RNA，加完消化缓冲液 DS 或溶菌酶后，加入 4  $\mu$ l RNase A（100 mg/ml）溶液，震荡混匀，室温放置 5min。
- 3 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液，55 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴 30min。
- 4 加入 220  $\mu$ l 裂解液 MS，漩涡振荡混匀，直至形成均一的悬浮液，65 $^{\circ}$ C 温浴 10min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
  - 加入裂解液 MS 时可能会产生白色沉淀，一般 65 $^{\circ}$ C 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细菌细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。
  - 如菌体超过 1.5 ml，可适当延长温浴时间。
- 5 加入 220  $\mu$ l 无水乙醇，上下颠倒混匀，此时可能出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中。12,000rpm 离心 1min，弃滤液。
  - 此时基因组 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。
  - 如柱子堵塞表明菌体过量。若发生此情况，减少菌量，或适当延长离心时间，直至洗脱液顺利离心至离心管为止。
- 6 加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 PS，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。
  - 此步骤的作用是去除硅胶膜上吸附的蛋白、脂质等杂质，以获得高质量基因组 DNA。
- 7 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。
  - 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 3 稀释，即含 75%乙醇。
- 8 加入 500  $\mu$ l 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液，12,000 rpm 离心 3min，以彻底去除纯化柱中残留的液体。
  - 此步骤的作用是去除残留乙醇，避免影响后续的酶促反应（PCR 或酶切）。同时利于基因组 DNA 充分溶解。
- 9 将纯化柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱中央处，悬空滴加 30-100 $\mu$ l 洗脱液 TE。室温放置 2min。
- 10 12,000 rpm 离心 2min，管底即为高纯度基因组 DNA。-20 $^{\circ}$ C 保存。
  - 洗脱液 TE 可用去离子水代替，但其 pH 需为 8.0-8.5。
  - 对洗脱液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热，会提高基因组 DNA 的产量。

**Q&A**

**问：细菌基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA，为什么？**

**答：**基因组 DNA 收率较低时，可以从以下几个方面考虑：

- 1 实验材料太多，过多的裂解产物堵住离心柱，减少菌体用量。
- 2 收集培养细胞时离心力偏小，当细胞数量小于  $10^5$  时，可以适当提高离心力。
- 3 洗脱时对纯化液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热，会提高基因组 DNA 的产量。