Bacteria Genomic DNA Extraction Kit

细菌 DNA 提取试剂盒

说 明 书

【产品简介】

本试剂盒的抽提试剂采用独特的配方和添加剂，能高效的裂解细菌基因组，分离出高纯度的 DNA，还可以有效地抑制各种外源性和内源性的核酸酶，同时结合特制的纯化柱，能最大限度的保持核酸的完整性、高得率以及纯度。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LG-0106A（50 次）	LG-0106A（100 次）
RNase A	500μl	1ml
蛋白酶 K	1.2ml	2.4ml
缓冲液 PDB	12ml	24ml
裂解液 LB	36ml	72ml
缓冲液 BEH	4ml	8ml
漂洗液 WB1	20ml	40ml
漂洗液 WB2	12ml	24ml
洗脱液 EB	2mlx3	9ml
纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

注意：使用前请在按照标签提示漂洗液 WB1、WB2 中加入适量无水乙醇。如不立即使用，RNAase，蛋白酶 K 置于-20℃保存。

【试剂运输及储存条件】

本试剂盒置于室温（15-25℃）可保存；更长时间的保存可置于2-8℃。在2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，应在使用前置于37℃下溶解沉淀。

【自备实验器材】

试剂类：无水乙醇，异丙醇，溶菌酶(用于革兰氏阳性菌破壁处理)。

耗材类：经 DEPC 水处理并高压灭菌（121℃，30 分钟）的 2ml 和 1.5ml 离心管、10μl、200μl、1000μl 吸嘴、一次性手套及口罩。

设备类：电动匀浆机、各种规格的移液器、低温和常温台式离心机、震荡仪、研钵，手术刀，金属镊子。

【操作步骤】

1. 将 3-5ml 菌液室温 10,000rpm 离心 1min 浓缩收集，直至将全部的菌沉淀收集。

   注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入180 μl缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0；2 mM Na2-EDTA；1.2% Triton；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 ℃处理30 min以上。

2. 加入 200μl 缓冲液 PDB，用移液器吸打混匀菌沉淀。
3. 加入 20μl 蛋白酶 K，56℃温水浴 30min，然后置于 70℃水浴 10min。
4. 加入 10μl RNase A，用移液器吸打混匀，室温放置 5-10 min。
5. 加入 600μl 裂解液 LB 和 80μl 缓冲液 BEH，用移液器吸打混匀，室温静置 5min。
6. 加入 530μl 预冷的异丙醇，轻柔颠倒数次直至彻底混匀。

7. 吸取 700µl 裂解物以及有可能形成的沉淀至纯化柱，室温 11,000rpm 离心 15s。
8. 弃尽流穿液，重复步骤 7，直至将剩余样品全部通过纯化柱。
9. 往纯化柱内加入 700µl 漂洗液 WB1，室温 11,000rpm 离心 15s，反复操作，弃尽废液。
   注意：第一次使用前请确认是否按标签提示往漂洗液WB1中加入适量无水乙醇。
10. 往离心柱中加入 500µl 漂洗液 WB2，11,000xg，室温离心 15s，反复操作，弃尽废液。
    注意：第一次使用前请确认是否按标签提示往漂洗液WB2中加入适量无水乙醇。
11. 往离心管中加入 500µl 漂洗液 WB2，11,000xg，室温离心 15s，反复操作，弃尽废液。
12. 室温 11,000rpm 离心空柱 1min 干燥硅胶模。
13. 往膜中央滴加 50µl 65℃预热的洗脱液 EB，室温放置 3min，室温 11,000rpm 离心 1min，收集 DNA。
14. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第13步洗脱。
15. 如需后续操作，请始终将溶解的 DNA 至于冰上，保存请置于-80℃

注意：为增加基因组 DNA 的得率，洗脱液体积不应少于 50µl，体积过小会影响回收效率，洗脱液的 pH 值也对洗脱效率有很大影响，若用 ddH_2O 洗脱液应保证 pH 7.0-8.5 范围内，pH 低于 7.0 会影响洗脱效率；DNA 需置于-20℃保存，以防止 DNA 降解。

【DNA定量】

实例：用常规比色皿测量RNA浓度。

DNA样品总体积：50µl
稀释因子，1:100（10µl DNA样品+990µl无核酸酶高压灭菌水）
A260读值：0.20（在1ml比色皿中测量）
因此，DNA样品浓度= 50×A260×稀释因子=50×0.20×100=1000µg/ml
DNA样品的得率=1000×0.05=50µg

实例：用超微量比色皿测量DNA浓度。

DNA样品总体积：50µl
稀释因子，1:100（1 µl DNA样品+99 µl无核酸酶高压灭菌水）
A260读值：0.20（在超微比色皿中测量）
因此，DNA样品浓度= 50×A260×稀释因子=50×0.20×100=1000µg/ml
DNA样品的得率=1000×0.05=50µg

【注意事项】

1. 操作时请使用一次性手套和口罩。
2. 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB1、WB2中加入适量乙醇。
3. 为增加裂解效果，可在裂解液LB中加入终浓度为0.1%的巯基乙醇，但加入巯基乙醇后，会降低裂解液LB的稳定性，推荐现用现加。

【有效期】

本试剂盒有效期为12个月，请在有效期内使用。

注：本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。