

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (溶液型)

货号： NG409S 100次
NG409M 200次

试剂盒组成	保存	100 次	200 次
细胞核裂解液	室温	60 ml	120 ml
蛋白沉淀液	室温	20 ml	40 ml
DNA 溶解液	室温	15ml	30 ml
RNase A(10mg/ml)	-20°C	250µl	400µl

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°C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°C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于 DNA 溶解液。

产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂。
2. 快速,简捷,单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 结果稳定,产量高,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型比值达 1.7~1.9,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**,离心机转速需达到13,000 rpm。
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)、lysostaphin(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

操作步骤:(实验前请先阅读注意事项)

1. 收集 1 毫升过夜培养细菌加入 1.5 毫升离心管。
2. 9,000rpm 离心 30 秒,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 480µl 50mM EDTA 完全重悬细胞。
4. 加入 120µl 溶菌酶 (20mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 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 albidium, 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 60µl 溶菌酶(20mg/ml)和 60µl lysostaphin (20mg/ml)确保有效裂解。
5. 37°C温育 30-60 分钟。12,000rpm 离心 2 分钟,弃上清,涡旋或轻弹打散细胞沉淀。
6. 加入 600µl 细胞核裂解液至打散的细胞,轻柔吹打裂解细胞。
7. 80°C温育 5 分钟裂解细胞,然后冷却至室温。
8. 加入 1.8µl RNase A (10mg/ml) 至裂解物中至终浓度 30µg/ml。颠倒混匀后 37°C温育 15-60 分钟去除残留 RNA。然后室温冷却至少 5 分钟使回复到室温。

9. 在恢复到室温的裂解物内加入 200 μ l 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，最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器。
10. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底白色的蛋白沉淀，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 1.5ml 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 2 分钟后取上清。
12. 加入等体积的室温异丙醇（约 600 μ l），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 12,000rpm 离心 1 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 1ml 70%乙醇后，颠倒漂洗 DNA 沉淀，12,000rpm 离心 1 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。
15. 加入 0.5ml 70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，12,000rpm 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 100 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。