



Bacteria Genomic DNA Kit

细菌基因组DNA提取试剂盒

Cat. No. CW0552

产品简介

本试剂盒适用于从革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌中提取高纯度总DNA，每次可处理 10^6 – 10^9 个细胞，获得多至20 μ g的总DNA。纯化过程中不需苯酚或氯仿等有毒溶剂，一小时内即可获得高纯度DNA。本试剂盒采用优化的缓冲体系使裂解液中的DNA高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他污染物可流过膜，PCR和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度DNA。纯化得到的DNA可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

保存条件： 室温（15–30°C）

产品内容

Component	CW0552 50 preps
Buffer ATL	15mL
Buffer AL	15mL
Buffer AW1 (concentrate)	13mL
Buffer AW2 (concentrate)	15mL
Buffer EB	15mL
Proteinase K	1.25mL
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

自备试剂

无水乙醇; 提取革兰氏阳性菌需自备Enzymatic Lysis Buffer。

Enzymatic Lysis Buffer配制方法: 50mM Tris, pH8.0; 10 mM Na₂-EDTA, pH8.0。121°C灭菌处理20分钟, 加入适量的Lysozyme (溶菌酶) 其浓度为100mg/mL。

实验前准备及重要注意事项

1. 样品应避免反复冻融, 否则会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。
2. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组, 建议在对数生长期早期收集样品。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer AW1和Buffer AW2中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查Buffer ATL和Buffer AL是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀出现, 请将Buffer AL和Buffer ATL于56°C水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对RNA污染比较敏感, 可以在加入Buffer AL前加入4 μ L DNase-Free的RNase A (100mg/mL), RNase A本试剂盒并未提供, 如需要可单独向本公司订购, 货号: CW0601S。
6. 如果提取样品为革兰氏阳性菌, 需客户自行配制Enzymatic Lysis Buffer处理菌体, 其中需使用浓度为100mg/mL的Lysozyme (溶菌酶), Lysozyme本试剂盒并未提供, 如需要可单独向本公司订购, 货号: CW0887S。

操作步骤

i 革兰氏阴性菌基因组DNA的提取

1. 取细菌培养物1-5mL (10^6 - 10^8 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管(自备)中, 12,000rpm (~13,400 \times g) 离心1分钟, 尽量吸净上清。
2. 向沉淀中加入200 μ L Buffer ATL, 振荡使菌体重悬。
3. 加入20 μ L Proteinase K, 涡旋混匀, 56°C孵育, 直至溶液变清亮, 孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

注意: 如需去除RNA, 可在上述步骤完成后, 加入4 μ L浓度为100mg/mL的RNaseA溶液(货号: CW0601S), 震荡混匀, 室温放置5-10分钟。

4. 加入200 μ L Buffer AL, 涡旋震荡充分混匀。加200 μ L无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。

注意: 1) 如果多个样品一起操作, Buffer AL和无水乙醇可以等比例混匀后一起加入, 震荡混匀。

2) 加入Buffer AL和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

5. 将步骤4所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中,若一次不能加完溶液,可分多次转入。10,000rpm离心1分钟,弃废液,将吸附柱放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入500 μ L Buffer AW1(使用前检查是否已加入无水乙醇),13,000rpm离心1分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入500 μ L Buffer AW2(使用前检查是否已加入无水乙醇),13,000rpm离心1分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放回收集管中。

注意:如需进一步提高DNA纯度,可重复步骤7。

8. 13,000rpm离心2分钟,倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟,以彻底晾干。
注意:这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除,乙醇残留会影响后续酶促反应(酶切、PCR等)。
9. 将吸附柱置于一个新的离心管中,向吸附柱的中间部位悬空加入50-200 μ L Buffer EB,室温放置2-5分钟,10,000rpm离心1分钟,收集DNA溶液,-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意:

- 1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感,可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响,若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5(可以用NaOH将水的pH值调到此范围),pH值低于7.0时洗脱效率不高。
- 2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。
- 3) 用另外的50-200 μ L Buffer EB或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
- 4) 如果要提高DNA的终浓度,可以将步骤9所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上,重复步骤9;若洗脱体积小于200 μ L,可以增加DNA的终浓度,但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μ g,推荐用50 μ L Buffer EB或灭菌水洗脱。
- 5) 保存在水中的DNA会受到酸性水解作用影响,如需长期保存,推荐用Buffer EB洗脱并于-20 $^{\circ}$ C保存。

ii 革兰氏阳性菌基因组DNA的提取

1. 取细菌培养物1-5mL(10^6 - 10^8 个细胞,最多不超过 2×10^9 个细胞)置于离心管(自备)中,12,000rpm($\sim 13,400 \times g$)离心1分钟,尽量吸净上清。
2. 加入160 μ L Enzymatic Lysis Buffer和20 μ L Lysozyme(100mg/mL)(自备)使菌体重悬。Enzymatic Lysis Buffer配制方法见说明书前部分自备试剂。
3. 37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。
4. 加入20 μ L Proteinase K涡旋震荡,充分混匀。加入200 μ L Buffer AL,涡旋震荡混匀。

注意:不要把Proteinase K直接加到Buffer AL中。

5. 56℃孵育30分钟。

注意: 1) 如果需要, 95℃孵育15分钟可以使病原体失活, 但是95℃孵育会造成一些DNA的降解。

2) 如需去除RNA, 可在上述步骤完成后, 加入4μL浓度为100mg/mL的RNaseA溶液(货号: CW0601S), 震荡混匀, 室温放置5-10分钟。

6. 加入200μL无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。

注意: 加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

7. 将步骤6所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM), 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。10,000rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向吸附柱中加入500μL Buffer AW1(使用前检查是否已加入无水乙醇), 13,000rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入500μL Buffer AW2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 13,000rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤9。

10. 13,000rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟彻底晾干。

注意: 这一步目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇残留会影响后续酶促反应(酶切、PCR等)。

11. 将吸附柱置于一个新离心管(自备)中, 向吸附柱中间部位悬空加入50-200μL Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 10,000rpm离心1分钟, 收集DNA溶液, -20℃保存DNA。

注意: 1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5(可以用NaOH将水的pH值调到此范围), pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

3) 用另外的50-200μL Buffer EB或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高DNA的终浓度, 可以将步骤11所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上, 重复步骤11; 若洗脱体积小于200μL, 可以增加DNA的终浓度, 但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1μg, 推荐用50μL Buffer EB或灭菌水洗脱。

5) 保存在水中的DNA会受到酸性水解作用影响, 如需长期保存, 推荐用Buffer EB洗脱并于-20℃保存。