

细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书

货号：AC11010

规格：50T/ 100T

保存：常温保存，复检期一年。（注：RNase A、蛋白酶 K 以附件形式发货，-20℃保存）

试剂盒内容：

组份	50T	100T	保存
RNase A	100 μ L \times 2	100 μ L \times 4	-20℃
蛋白酶 K	1 mL	1 mL \times 2	-20℃
溶液 A	15 mL	30 mL	RT
溶液 B	15 mL	30 mL	RT
漂洗液	15 mL	15 mL \times 2	RT
洗脱液	10 mL	20 mL	RT
吸附柱	50 个	100 个	RT
收集管	50 个	100 个	RT
说明书	1 份	1 份	-

产品简介：

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，提取细菌基因组 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，能够高效专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。使用本试剂盒提取的基因组 DNA 可用于各种常规操作，包括酶切、PCR、文库构建、Southern 杂交等实验。

操作步骤（仅供参考）：

使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签（每瓶需要单独加入 45mL 无水乙醇）。所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。本试剂盒仅适用于革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌，若用于革兰氏阳性菌基因组提取困难，需自备部分试剂或者选购《AC11011-革兰氏阳性菌基因组 DNA 提取试剂盒》。

1. 取细菌培养液 1-5 mL，12000 rpm 离心 1 min.，尽量吸除上清。
2. 向菌体中加入 250 μ L 溶液 A，振荡或用移液器吹打使菌体充分悬浮，向悬浮液中加入 4 μ L 的 RNase A，振荡 15sec，室温放置 5 min。

注意：如果是革兰氏阳性菌，可在第 2 步操作前加入溶菌酶溶液进行破壁处理，溶菌酶需自备，具体方法为：向菌体加入 500 μ L 70%乙醇，冰浴 20min，12000rpm 离心 1min，弃上清，菌体沉淀加入 70 μ L 溶菌酶溶液（50-100mg/mL），37℃处理 30-60min。

3. 向管中加入 20 μ L 的蛋白酶 K(10mg/mL)，充分混匀，70℃放置 10 min，此时可见菌液呈清亮粘稠状。
4. 向管中加入 220 μ L 溶液 B，振荡 15sec，70℃放置 10 min，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

5. 向管中加入 220 μL 无水乙醇，充分混匀，振荡 15sec，溶液变清亮，此时还可能会出现絮状沉淀，不影响 DNA 的提取，可将溶液和絮状沉淀都加入到吸附柱中，静置 2 min。
6. 12000 rpm 离心 2 min. 弃废液，将吸附柱放入收集管中。
7. 向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)。12000 rpm 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
8. 向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液。12000 rpm 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
9. 重复操作步骤 8。
10. 12000 rpm 离心 2 min，将吸附柱敞口置于室温或 50°C 温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续实验，如酶切、PCR 等。
11. 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200 μL 经 65°C 水浴预热的洗脱液，室温放置 5 min，12000 rpm 离心 1 min。
12. 离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min，即可得到高质量的细菌基因组 DNA。

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. 若试剂盒中的溶液出现沉淀，可在 65°C 水浴中重新溶解后再使用，不影响提取效果。
3. 如果实验中的离心步骤出现柱子堵塞的情况，可适当延长离心时间。
4. 洗脱缓冲液的体积最好不少于 50 μL ，体积过小会影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。
5. DNA 浓度及纯度检测：得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀ 值为 1.0 相当于大约 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双链 DNA、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

相关产品:

- AC10989 6×DNA Loading Buffer
- AC17137 50×TAE 缓冲液
- AC17133 5×TBE 缓冲液
- AC11938 GoldView II 型核酸染色剂(5000×)
- AC10997 质粒小量提取试剂盒

相关文献:

- [1] Jirong Lan, Yan Sun, Li Guo, et al. A novel method to recover ammonia, manganese and μL fate from electrolytic manganese residues by bio-leaching. Journal of Cleaner Production. June 2019;499-507. (IF 5.651)