

## 革兰氏阳性菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书

货号: AC11011

规格: 50T/ 100T

保存: 溶菌酶2-8°C保存; RNase A, 蛋白酶K溶液-20°C保存;

其他室温(15°C-25°C) 干燥保存, 复检期 12 个月, 2°C-8°C保存时间更长。

试剂盒内容:	AC11011-50T	AC11011-100T
溶菌酶	0.3g	0.5g
RNase A	1ml	1ml×2
蛋白酶 K	1ml	1ml×2
溶液 A	10ml	20ml
溶液 B	10ml	20ml
漂洗液	15ml	15ml×2
洗脱液	15ml	30ml
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 个
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, 提取革兰氏阳性菌基因组 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:

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。所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 取细菌培养液 1ml, 12000rpm 离心 1min., 尽量吸除上清。
2. 向菌体中加入 200ul 终浓度为 20mg/ml 的溶菌酶, 用溶菌酶干粉加入缓冲液 20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 1.2% Triton X-100, 37 °C 处理 30 min 以上。(如果需要去除 RNA, 可加入 20ul RNase A (10 mg/ml) 溶液)
3. (可选作) 向上述溶液中加入 200ul 溶液 A, 振荡或用移液器吹打使菌体充分悬浮, 室温放置 30min-60min。
4. 向管中加入 20ul 的蛋白酶 K (10mg/ml), 充分混匀, 55°C 消化 30-60min, 消化期间可颠倒离心管混匀数次, 直至样品消化完全为止, 此时可见菌液呈清亮粘稠状。
5. 向管中加入 200ul 溶液 B, 充分颠倒混匀, 如出现白色沉淀, 可于 75°C 放置 15-30min, 沉淀即会消失, 不影响后续实验。如果溶液未变清亮, 说明样品消化不彻底, 可能会导致 DNA 的提取量以及纯度降低, 还可能堵塞吸附柱。
6. 向管中加入 200ul 无水乙醇, 充分混匀, 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 2min。

7. 12000rpm 离心 2min. 弃废液，将吸附柱放入收集管中。
8. 向吸附柱中加入 600ul 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)。12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
9. 向吸附柱中加入 600ul 漂洗液， 12000rpm 离心 1 min， 弃废液，将吸附柱放入收集管中。
10. 12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50℃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 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，12000rpm 离心 1min。
12. 离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置 2min ，12000rpm 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℃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 50ul，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℃，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 OD<sub>260</sub> 处有显著吸收峰，OD<sub>260</sub> 值为 1.0 相当于大约 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。