

细菌基因组 DNA 分离试剂盒简明说明书(BW-GD2411)

Ver: 1912

产品简介

细菌基因组 DNA 分离试剂盒提供了一种快速且简便的方法分离从各种来源的细菌细胞内的基因组。对数生长期的细菌被收集，通过 Lysozyme 消化和 Proteinase K 裂解，样品吸附到 DNA 柱。

每个 DNA 柱可结合约 100 µg 基因组 DNA。每个柱子至多可承载 1 × 10⁹ 个细菌细胞。该试剂盒可分离所有细胞的 DNA，包括质粒 DNA。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	4	50	250
DNA Mini Columns	4	50	250
2 mL Collection Tubes	4	50	250
Buffer TL	1.0 mL	13 mL	65 mL
Buffer BL	1.0 mL	13 mL	65 mL
Buffer KB	2.2 mL	28 mL	130 mL
DNA Wash Buffer*	2.0 mL	15 mL	3 x 24 mL
Glass Beads	120 mg	1.5 g	7.0 g
Elution Buffer	2 mL	15 mL	70 mL
Lysozyme**	5 mg	50 mg	5 x 50 mg
Proteinase K	110 µL	1.3 mL	5 x 1.3 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	270 µL	1.4 mL
User Manual	1	1	1

要点

- **Lysozyme:** 请按标准将其溶解至 50 mg/mL。建议分装成小管并储存于 -20°C，使用前置于室温。加入 100 µL (BW-GD2411-00) 或 1 mL (BW-GD2411-01) 或 1 mL (BW-GD2411-02) Elution Buffer 至每管 Lysozyme。
- **DNA Wash Buffer:** 加入 8 mL (BW-GD2411-00) 或 60 mL (BW-GD2411-01) 或 96 mL (BW-GD2411-02) 无水乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内，终浓度为 80%。
- 低温下 Buffer BL 可能形成结晶，使用前请于 37°C 加热溶解。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月，请按以下方式储存：

- Proteinase K 可于室温 (15-25°C) 稳定储存一年。长期储存，建议分装 Proteinase K 和 Lysozyme 并储存于 -20°C。
- 其他试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。

实验前需准备的材料

- 离心机
- 无菌的 1.5 mL 离心管
- 水浴锅
- 无水乙醇
- 恒温水浴摇床 (50°C)

操作步骤

此方法适用于从对数生长期的 1-3 mL 菌液中提取基因组。

革兰氏阴性菌

1. 取 1-3 mL 菌液，12,000 ×g 离心 2 min，弃上清。加入 **200 µL Buffer TL** 和 **25 µL Proteinase K**。

可选: 加入 **5 µL RNase A** (20 mg/mL)，吹打混匀。

2. 加入 **220 µL Buffer BL**，涡旋之后 55°C 孵育 10 min，加入 **Buffer BL** 后可能形成纤维沉淀 (沉淀不影响 DNA 纯化)。

3. 加入 220 µL 无水乙醇，涡旋 20 s 混匀。

4. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**，加入步骤 3 获得的样品，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

5. 加入 **500 µL Buffer KB**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。

6. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入无水乙醇)，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。

7. 重复步骤 6。

8. 打开柱盖，12,000 ×g 离心 2 min。

注: 开盖离心有助于去除残留乙醇，洗脱前除去乙醇至关重要。

9. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的离心管，加入 **50-200 µL Elution Buffer**，室温静置 2 min，12,000 ×g 离心 1 min。

可选: 将洗脱下的 DNA 二次上柱洗脱将会得到另外 20-30% 的 DNA，第一次洗脱可得到 60-70% 的 DNA。

革兰氏阳性菌

1. 取 1-3 mL 菌液，12,000 ×g 离心 2 min，弃上清。

2. 加入 **180 µL TE** 或者 **Elution Buffer** 重悬沉淀。加入 **18 µL Lysozyme** 和 **5 µL RNase A** (20 mg/mL)，30°C 孵育 30 min。

注：完全消化细胞壁有助于有效裂解，延长孵育时间可能会得到更高产量的基因组 DNA。

3. 5,000 ×g 离心 5 min，弃滤液，保留 **10 μL** 上清。
4. 加入少许 **Glass Beads**（约 25 mg）和 **200 μL Buffer TL**，重悬细胞，最大速度涡旋 2 min。使玻璃珠沉淀至管底，将上清液转移至 1.5 mL 离心管。
5. 加入 **25 μL Proteinase K**，涡旋 10 s，瞬时离心。
6. 将样品置于 50°C 恒温摇床孵育 30 min，若没有恒温摇床，每隔 2-3 min 涡旋一次以混匀。
7. 加入 **220 μL Buffer BL**，涡旋，65°C 孵育 10 min，加入 **Buffer BL** 后可能形成纤维沉淀（沉淀不影响 DNA 纯化）。
8. 加入 220 μL 无水乙醇，涡旋 20 s 混匀。
9. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**，加入步骤 8 获得的样品，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。
10. 加入 **500 μL Buffer KB**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。
11. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**（使用前按要求加入无水乙醇），10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将柱子放回收集管。
12. 重复步骤 11。
13. 打开柱盖，12,000 ×g 离心 2 min。

注：开盖离心有助于去除残留乙醇，洗脱前除去乙醇至关重要。

14. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的离心管，加入 **50-200 μL Elution Buffer**，室温静置 2 min，12,000 ×g 离心 1 min 洗脱 DNA。

可选：将洗脱下的 DNA 二次上柱洗脱将会得到另外 20-30% 的 DNA，第一次洗脱可得到 60-70% 的 DNA。

DNA 质量和浓度的确定

总 DNA 的产量可通过分光光度计测定，需要使用蒸馏水，Tris-HCl 或 Elution Buffer 作为空白对照。将洗脱下来的 DNA 溶液用 TE Buffer 稀释，DNA 浓度可通过如下方式计算：

$$\text{【DNA】} = A_{260} \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (\text{稀释倍数})$$

DNA 质量可通过在 280 nm 和 260 nm 处的吸光度评估， A_{260}/A_{280} 的值在 1.7-1.9 通常表明 DNA 的纯度在 85-95%。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com