



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-times.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: RTG2401)

● 试剂盒内容及保存:

Ver.730476

试剂盒组成	RTG2401-01 (50 次)	RTG2401-02 (100 次)	贮存方式
缓冲液 GA	15 ml	30 ml	室温
缓冲液 GB	15 ml	30 ml	室温
去蛋白液 GD(浓缩液)	18 ml	36 ml	室温
漂洗液 PW(浓缩液)	25 ml	25 ml	室温
洗脱缓冲液 EB	15 ml	2×15 ml	室温
蛋白酶 K (20 mg/ml)	1 ml	2×1 ml	-20℃
溶菌酶 (5 mg/ml)	1ml	2×1ml	-20℃
RNase A (10 mg/ml)	0.5 ml	1 ml	-20℃
吸附柱 CG	50 个	100 个	室温
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	室温
说明书	1 份	1 份	

● 储存、效期及运输:

本试剂盒在常温(25℃左右)干燥条件下,可保存1年;更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下,若溶液产生沉淀,应在使用前置于37℃下溶解沉淀至溶液澄清后再使用。单独包装的蛋白酶K、溶菌酶和RNaseA收到后-20℃保存。

蛋白酶K、溶菌酶和RNaseA湿冰运输,其余组份常温运输。

● 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(革兰氏阳性菌和阴性菌)的基因组DNA。溶菌酶能有效去除细菌细胞壁;蛋白酶K能把核酸解离出来;RNaseA能去除痕量的RNA污染;离心吸附柱能够高效、专一吸附DNA,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。

使用本试剂盒回收的DNA适用于各种常规操作,包括酶切、PCR、文库构建、Southern杂交等实验。

● 提取得率:

材料	提取量	DNA 得量
细菌培养液	10^8-10^{10} cells	10-20 μ g (革兰氏阴性菌)
		6-10 μ g (革兰氏阳性菌)

● 准备工作:

1. 准备55℃和70℃水浴;无水乙醇;1.5 ml 灭菌离心管。
2. 按照标签所示在去蛋白液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇,混匀后盖紧瓶盖后室温贮存备用。
3. 每次使用前请检查缓冲液GA,缓冲液GB和去蛋白液GD是否有沉淀生成,如果出现沉淀,37℃温浴至沉淀溶解后再使用。

● 操作步骤:

如非指出, 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 1-2 ml, 10,000 g 离心 1 分钟, 尽量吸净上清; 向细菌沉淀中加入 180 μ l EB, 旋涡混匀后加入 18 μ l 溶菌酶, 室温放置 10-15 分钟, 期间间歇混匀几次。
注: 溶菌酶的用量和处理时间与处理的细菌种类密切相关, 用户可以根据细菌种类进行调节。如革兰氏阳性菌应将处理时间延长到 30-60 分钟。
2. 10,000g 离心 1 分钟, 吸弃大部分上清, 留下约 10 μ l 液体, 彻底混匀。
注: 由于余留的液体较少, 彻底混匀菌体不太容易, 用手指弹动管壁附加枪头反复吹打既能完全混匀菌体。混匀一定要彻底, 否则容易导致步骤 8 中离心柱堵塞。
3. 向菌体沉淀中加入 200 μ l 缓冲液 GA, 混匀。
4. 向管中加入 20 μ l 蛋白酶 K, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 处理 15-30 分钟, 期间间歇混匀 2-3 次至溶液清亮。
注: 加入蛋白酶 K 后会产生絮状物, 消化彻底的标志是絮状物完全消失, 溶液变清亮。如消化不彻底, 会导致步骤 8 中离心柱堵塞。
5. 加入 10 μ l RNaseA (10 mg/ml) 溶液, 混匀后室温放置 2 分钟。
6. 加入 220 μ l 缓冲液 GB, 混匀, 70 $^{\circ}$ C 放置 10-30 分钟 (对于革兰氏阳性菌, 时间应延长到 60 分钟)。
注: 加入缓冲液 GB 时可能会产生白色沉淀, 一般 70 $^{\circ}$ C 放置相应时间后溶液会变清亮。如溶液未变清亮, 应延长 70 $^{\circ}$ C 处理时间。如果絮状物不能处理干净, 容易导致步骤 8 中离心柱的堵塞。
7. 加入 220 μ l 无水乙醇, 充分混匀。
注: 加入乙醇后会产生絮状沉淀, 可用枪头反复抽打 1-2 次将沉淀弄碎后再上柱。如果絮状物未做处理, 容易导致步骤 8 中离心柱的堵塞。
8. 将上一步所得溶液和絮状沉淀加入到吸附柱 CG 中 (吸附柱放入收集管中), 11,000g 离心 5 分钟, 倒掉废液, 吸附柱 CG 放入收集管中。
注: 如果出现吸附柱堵塞现象, 可将离心时间延长到 10 分钟。
9. 向吸附柱 CG 中加入 500 μ l 去蛋白液 GD (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 11,000 g 离心 2 分钟, 倒掉废液, 吸附柱放入收集管中。
10. 向吸附柱 CG 中加入 700 μ l 漂洗液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 11,000 g 离心 60 秒, 倒掉废液, 吸附柱放入收集管中。
11. 向吸附柱 CG 中加入 500 μ l 漂洗液 PW, 11,000 g 离心 60 秒, 倒掉废液。
12. 吸附柱 CG 放回收集管中, 11,000 g 离心 2 分钟。
注: 此步骤非常重要, 其目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。
13. 将吸附柱 CG 转入一个干净的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l 经 70 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 分钟, 11,000 g 离心 2 分钟。
**注: ① 洗脱缓冲液体积最好不少于 50 μ l, 体积过小影响回收效率。
② 洗脱液的 pH 值对于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 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。**
14. DNA 产物-20 $^{\circ}$ C 保存。

● DNA 浓度及纯度检测:

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。提取的 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。可配制 0.8-1.0% 琼脂糖凝胶, 使用 λ /HindIII 判断基因组的大小, 完整的基因组大小应在 23 kb 以上。使用分光光度计检测时, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9 之间, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水洗脱, 比值可能偏低, 但并不表明 DNA 纯度不高。