

细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

KD304 100次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KD304
平衡液	室温	10ml
缓冲液 RB	室温	60ml
结合液 CB	室温	20ml
抑制物去除液 IR	室温	50ml
漂洗液 WB	室温	25ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20ml
蛋白酶 K 溶液 (可选) 20mg/ml	4°C或者室温	1ml*2
吸附柱 AC 和收集管 (2ml)	室温	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀,可以在 37°C水浴几分钟帮助重新溶解, 恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
2. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输。收到后, 不超过 25°C室温至少保存 6 个月, 4°C保存 12 个月, -20°C保存 2 年。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍:

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30kb-50kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

注意事项:

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机。
2. 开始实验前根据需要将水浴预热到 37°C 或者 70°C 备用。
3. 需要自备异丙醇。
4. 需自备 0.5M EDTA、Triton X-100 和 Lysozyme (溶菌酶) (用于革兰氏阳性菌)。
5. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20°C。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

关于平衡液的使用:

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团, 提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液, 若不小心碰到, 请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成, 请加热至 37°C使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示: 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入 100ml 无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!

1. 取 0.5-2 毫升培养菌液 (最多不超过 2×10^9 个细胞), 10,000rpm, 离心 30 秒, 尽可能的吸弃上清, 收集菌体。

起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整, 但是离心吸附柱最大吸附能力是 20 μ g 基因组 DNA, 如果菌体过量超过最大吸附能力, 反而会严重降低产量。

2. 加入 200 μ l 缓冲液 RB 重悬, 10,000rpm 离心 30 秒, 弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 180 μ l 缓冲液 RB 中。

注意: 对于较难破壁的革兰氏阳性菌, 略过第 2 步骤, 加入溶菌酶进行破壁处理, 具体方法为: 加入 180 μ l 缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为 20 mg/ml 的溶菌酶(溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制, 否则会导致溶菌酶无活性)), 37°C 处理 30 min 以上。

3. 加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液, 充分混匀, 再加入 200 μ l 结合液 CB, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 在 70°C放置 10 分钟。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多, 需要去除 RNA, 可以在加入 200 μ l 结合 CB 前加 20 μ l

RNaseA(25mg/ml)溶液, 振荡混匀, 室温放置 5- 10 分钟。

平衡液预处理吸附柱备用:

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

4. 冷却后加入 100 μ l 异丙醇, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 此时可能会出现絮状沉淀。**上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量, 必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 秒混匀。**
5. 将上一步混合物 (包括可能的沉淀) 加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
6. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液。
7. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
8. 加入 600 μ l 漂洗液 WB, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在**吸附膜的中间部位**加 100 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温放置 3-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 30 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
11. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 - 20 $^{\circ}$ C。

问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*蛋白酶 K 失效了建议: 收到蛋白酶 K 后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀建议: 加入结合液后, 和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀; 加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱, 如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。</p> <p>*有的革兰氏阳性菌需要特殊的酶裂解建议: 请详细参见步骤3, 了解提取细菌的特性</p>
未提取到 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇建议: 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</p>
洗脱下来的 DNA 产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇建议: 确保做了步骤 9, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液建议仔细阅读 仔细阅读注意事项 6 和步骤 10 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。</p>
A260 吸光值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应建议: 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p> <p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应建议: 确保做了步骤 9, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。</p>