



G⁺细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒 (G⁺ Bacteria Genomic DNA Kit)

目录号: ZP303 版本 2015/1/14

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP303-1 (20次)	ZP303-2 (50次)	ZP303-3 (100次)
Lysozyme(100 mg/ml)	400 µl	800 µl	2×800 µl
细胞悬浮液	15 ml	30 ml	60 ml
缓冲液 A	10 ml	15ml	30 ml
裂解缓冲液 S	1ml	1.5ml	5ml
缓冲液 B	10ml	15 ml	30 ml
缓冲液 C	15 ml	30 ml	60 ml
漂洗液 W2	15 ml	15 ml	2×15 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
蛋白酶 K	0.2ml	0.5ml	1ml
吸附柱	20 个	50 个	100 个
收集管 (2 ml)	20 个	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份	1 份

选配试剂: RNaseA (10 mg/ml) (目录号 : ZS106);

储存条件: 该试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下可保存 12 个月; 更长时间的保存可置于 2-8°C。加入 Lysozyme 后的细胞悬浮液应置于 2-8°C 保存, 可稳定保存半年。

产品简介:

本试剂盒采用溶菌酶的方法能够使革兰氏阳性菌细胞快速高效破壁, 特异性结合DNA的离心吸附柱和独特的缓冲液系统提取G⁺细菌的基因组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。

使用本试剂盒回收的 DNA 可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
G ⁺ 细菌培养液	1-5 ml	6 -20µg

产品特点:

简单快速: 一小时内即可获得超纯的基因组 DNA。

超 纯: 获得的 DNA 纯度高, 可直接用于 PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 样品应避免反复冻融, 否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
2. 若裂解缓冲液 S 或缓冲液 B 中有沉淀, 可在 56°C 水浴中重新溶解, 并摇匀后使用。
3. 所有的离心步骤均为使用台式离心机, 室温下离心。
4. 结核分枝杆菌可先用 75% 乙醇灭活和溶解脂质包膜后提取, 具体操作可咨询我公司。

操作步骤：

1. 取 G+细菌培养液 1-5 ml, 12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 分钟, 尽量吸净上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μl 细胞悬浮液 (**请先检查是否已加入 Lysozyme**),使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀, 37°C温浴 30 分钟每隔 5-10 分钟颠倒混匀数次。12,000 rpm (~13,400×g)离心 2 分钟, 尽量吸净上清。

3. 向菌体沉淀中加入 225μl 缓冲液 A, 振荡至菌体彻底悬浮。

如果需要去除 RNA, 可加入 6 μl RNaseA (10 mg/ml) 溶液 (客户自备, 目录号: ZS106), 振荡 5 秒混匀。

4. 向管中加入 10 μl 蛋白酶 K 溶液, 颠倒混匀。
5. 加入 25μl 裂解缓冲液 S, 颠倒混匀; 57°C水浴放置 20 分钟, 其间颠倒混匀 1-2 次。

6. 加入 250 μl 缓冲液 B, 振荡 5 秒充分混匀。

注意: a、加入缓冲液 B 时可能会产生白色沉淀, 但不会影响后续实验。

7. 加 250 μl 无水乙醇, 充分振荡混匀 15 秒, 此时可能会出现絮状沉淀, 瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。
8. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 将吸附柱放入收集管中。

注意: 如果常发生堵柱, 可开盖离心, 如还有液体离不下去, 则吸弃去除后继续下面的步骤。另一方面也说明样品量过大了, 应该减少样品量。

9. 向吸附柱中加入 500 μl 缓冲液 C, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 将吸附柱放入收集管中。

10. 向吸附柱中加入 700 μl 漂洗液 W2 (**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30 秒, 倒掉废液, 吸附柱放入收集管中。

11. 向吸附柱中加入 500 μl 漂洗液 W2, 12,000 rpm (~13,400×g)离心 30 秒, 倒掉废液,

12. 将吸附柱放回收集管中。然后 12,000 rpm (~13,400×g)离心 2 分钟。将吸附柱置于一个新的 1.5ml 离心管中, 室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意: 这一步的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. 将吸附柱转入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-200 μl 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟, 将溶液收集到离心管中。

注意: 为增加基因组 DNA 的得率, 可将离心得到的溶液再加入吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟。洗脱缓冲液体积不应少于 100 μl, 体积过小影响回收效率。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(可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保存在-20°C, 以防 DNA 降解。

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 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA、40 μg/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。