

## 牛奶细菌 DNA 提取试剂盒说明书

### 产品组成

|                |             |         |
|----------------|-------------|---------|
| 牛奶细菌 DNA 提取试剂盒 | 5 次样品       | 50 次制备  |
| Cat. No.       | 3111005     | 3111050 |
| 核酸纯化柱          | 5 个         | 50 个    |
| 2 ml 收集管       | 5 个         | 50 个    |
| 溶菌酶            | 12 mg       | 120 mg  |
| 蛋白酶 K 贮存液      | 120 $\mu$ l | 1.2 ml  |
| Buffer AT      | 1.8 ml      | 18 ml   |
| Buffer SL      | 2.4 ml      | 24 ml   |
| Buffer WA（浓缩液） | 1.9 ml      | 12 ml   |
| Buffer WB（浓缩液） | 1.5 ml      | 10 ml   |
| Buffer TE      | 0.6 ml      | 6 ml    |
| 产品说明书          | 1 份         | 1 份     |

### 产品储存与有效期

溶菌酶和蛋白酶 K 贮存液可室温运输，收到后请将溶菌酶置于 2~8℃ 储存，将蛋白酶 K 贮存液置于 -20℃ 储存，其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：电话：400-0099-857，QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn。

### 产品介绍

本试剂盒专为快速制备牛奶中各种细菌的基因组DNA而设计，可从牛奶样本中存在的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中分离纯化基因组DNA。细菌基因组DNA的产量因牛奶样本中的细菌密度和细菌种类而异。纯化后的基因组DNA可被所有测试过的限制性酶完全消化，并可用于PCR、荧光定量PCR和DNA微阵列等。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 去离子纯水和无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 恒温培养箱或水浴锅、旋涡振荡器
6. 可能需要 18 号注射器、溶葡萄球菌酶

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 将恒温培养箱或水浴锅温度调为 37℃ 和 56℃。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 根据一次提取的样品数（按每个样品需加 100  $\mu$ l 溶菌酶溶液计算）配制适量的 20 mg/ml 的溶菌酶溶液：例如要提取 10 个样品的细菌 DNA 时，则称取 21 mg 溶菌酶干粉，加入 1050  $\mu$ l 去离子纯水配制成 1050  $\mu$ l 的溶菌酶溶液。

**注意：**反复冻融溶菌酶溶液对其活性影响极大，如果一次配制了较多的溶菌酶溶液，应分成小份于 -20℃ 储存，解冻使用后的溶菌酶溶液如有剩余，应予以丢弃，不可再次冻存。

5. 对于已知具有溶菌酶耐性的革兰氏阳性菌，例如某些葡萄球菌属，需在溶菌酶溶液中补加溶葡萄球菌酶（未提供）。每 100  $\mu$ l 配好的溶菌酶溶液中补加 5  $\mu$ l 溶葡萄球菌酶溶液（2 mg/ml 水溶液）。

## 操作步骤

### 1A. 样品前处理：革兰氏阴性菌

- a. 将待检牛奶分装到 1.5 ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm（约 18000×g）离心 3 分钟。

\* 对于正常牛奶样品或亚临床乳腺炎样品，建议最多使用 1 ml 牛奶。对于临床乳腺炎样品，尤其是白细胞计数高的乳腺炎样品，建议最多使用 200 μl 的牛奶。如果样品非常黏稠且难以移液，请用配备 18G 针头的注射器抽吸样品几次以降低黏度。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 5 分钟。

- b. 打开管盖，用枪头绕离心管内壁挑破上层脂肪，弃上清液，并用纸巾或棉签擦净管壁上残留的油脂。

\* 注意不要让离心管底部的沉淀脱落。

\* 若上层油脂未擦净，可能会导致步骤 4 和步骤 5 出现堵柱，请尽量擦干净。

- c. 加入 300 μl Buffer AT 和 20 μl 蛋白酶 K 贮存液，盖上管盖，旋涡振荡充分悬浮沉淀。

### 1B. 样品前处理：未知菌或革兰氏阳性菌

- a. 将待检牛奶分装到 1.5 ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm（约 18000×g）离心 3 分钟。

\* 对于正常牛奶样品或亚临床乳腺炎样品，建议最多使用 1 ml 牛奶。对于临床乳腺炎样品，尤其是白细胞计数高的乳腺炎样品，建议最多使用 200 μl 的牛奶。如果样品非常黏稠且难以移液，请用配备 18G 针头的注射器抽吸样品几次以降低黏度。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 5 分钟。

- b. 打开管盖，用枪头绕离心管内壁挑破上层脂肪，弃上清液，并用纸巾或棉签擦净管壁上残留的油脂。

\* 注意不要让离心管底部的沉淀脱落。

\* 若上层油脂未擦净，可能会导致步骤 4 和步骤 5 出现堵柱，请尽量擦干净。

- c. 旋涡振荡打散沉淀，加入 100 μl 溶菌酶溶液，盖上管盖，再次旋涡振荡充分混匀，37℃ 孵育 30 分钟。

- d. 加入 200 μl Buffer AT 和 20 μl 蛋白酶 K 贮存液，盖上管盖，旋涡振荡混合均匀。

2. 将步骤 1 处理好的混合液置于 56℃ 孵育 10 分钟，其间旋涡振荡数次帮助细菌溶解。

3. 加入 400 μl Buffer SL，盖上管盖，旋涡振荡约 15 秒混匀。

4. 将步骤 3 的混合液倒入核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 μl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

\* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μl Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的 DNA 中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 60~100 μl Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃核酸纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20℃ 以下备用。