

## 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 离心管       | 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 贮存液可常温（0~30℃）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，该试剂盒可从牛奶样本中分离细菌基因组DNA。基因组DNA的产量因牛奶样本的细菌密度和存在的细菌种类而异。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，应分装成小份于 -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，14000 rpm (~20,000×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。如果样品非常粘稠且难以移液，请用配备 18G 针头的注射器抽吸样品几次以降低粘度。

\* 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，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，14000 rpm (~20,000×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。如果样品非常粘稠且难以移液，请用配备 18G 针头的注射器抽吸样品几次以降低粘度。

\* 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，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，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，期间旋涡振荡数次帮助细菌溶解。

3. 加入 400 μl Buffer SL，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 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心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 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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。

\* 此步骤是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，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 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在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。