

细菌 DNA 试剂盒说明书

产品组成

细菌 DNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备	250 次制备
Cat. No.	3302005	3302050	3302250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
溶菌酶	60 mg	600 mg	3 g
Buffer L1	2 ml	14 ml	70 ml
Buffer L2	2 ml	14 ml	70 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml	60 ml
Buffer WB (浓缩液)	1.5 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	2.5 ml	25 ml	125 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存与有效期

1. 溶菌酶请置于 2~8°C 储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30°C)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8°C，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

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

产品介绍

本产品适合从 1-5 ml 细菌培养物中分离纯化总 DNA。细菌经溶菌酶破壁处理后，被 Buffer L1 溶解，再经 Buffer L2 沉淀去除蛋白和细胞碎片，离心上清中的基因组 DNA 可结合到纯化柱上。经过 Buffer WA 和 Buffer WB 的洗涤，去除残留在膜上的蛋白与 PCR 抑制物后，基因组 DNA 用 Buffer TE 洗脱，并可立即用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 去离子纯水和无水乙醇。
2. 移液器及吸头（为避免样品间的污染，推荐选用含有滤芯的移液器吸头）
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. 水浴锅和旋涡振荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 37°C，并将 Buffer TE 温育至 37°C。
3. 根据一次提取的标本数(按每个标本需加 100 μl 溶菌酶溶液计算)配制适量的 100 mg/ml 的溶菌酶溶液：比如要提取 6 个标本的细菌基因组 DNA，则称取 60 mg 溶菌酶干粉，加入 600 μl 去离子纯水配制成 600 μl 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°C 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。

4. 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。

操作步骤：

1. 用1.5 ml离心管收集1-5 ml细菌培养物，加入200 µl Buffer TE，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如MRS培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入1 ml蒸馏水，旋涡振荡悬浮细菌后12000 rpm离心30秒，弃蒸馏水上清，再加入200 µl Buffer TE，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 某些特殊细菌培养后会改变培养基pH值（如乳酸杆菌），会抑制溶菌酶的活性，在离心收集细菌后也需要洗涤一次，方法同上。

* 细菌收集方法：

A. 悬浮培养的细菌：12000 rpm离心30秒收集1-5 ml细菌培养物中的细菌，弃培养基。

B. 培养皿中的单菌落：在1.5 ml离心管中加入200 µl Buffer TE，用接种环刮取菌落，将细菌洗脱在Buffer TE中。

2. 加入100 µl溶菌酶溶液，旋涡振荡约15秒混匀，37°C水浴10分钟。

* 大部分细菌水浴10分钟后已经充分破壁，但是某些细胞壁较厚的细菌（比如金黄色葡萄球菌）延长水浴时间（30分钟以上）可以提高DNA得率。

* 某些特殊细菌会生成荚膜，使得溶菌酶无法裂解细胞壁。此时则省略本步骤，直接将收集好的细菌进行液氮研磨或样本裂解管（Simgen Cat. No.C-001-3）研磨，研磨好后将菌液转移至一个新的1.5 ml离心管中，并用去离子纯水补到300 µl，再进入步骤3操作。

3. 加入225 µl Buffer L1，盖上管盖，剧烈摇晃3~5次，旋涡振荡30秒。

* 如果从新鲜培养的细菌中提取DNA，可能会将细菌中的部分RNA一起分离纯化出来，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验。如果要彻底除去RNA，可在本步骤中补加4 µl RNase A（100 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001011，本试剂盒不提供）。

* 如果本步骤操作后发现溶液变得非常粘稠，可能是细菌用量过多所致，需用移液器吸打8-10次，再剧烈旋涡振荡30秒。

4. 加入225 µl Buffer L2，盖上管盖，剧烈摇晃3~5次，再旋涡振荡30秒。

5. 13000 rpm离心2分钟。

6. 将步骤5中的上清液倒入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于2 ml离心管中），盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

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，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。

8. 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。

9. 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。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

10. 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，在纯化柱中央加100~200 µl 37°C温育的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。

11. 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°C备用。