

M5 细菌基因组 DNA 中量/大量提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 细菌基因组 DNA 中量/大量提取试剂盒	20T	M662-01

【储存条件】

RNase A(10mg/ml) -20℃ 保存, 其他组分室温储存。

【产品简介】

本试剂盒用于快速的从各种细菌中提取基因组 DNA。细菌样品加入细胞核裂解液(或者通过溶菌酶或者其它一些酶帮助裂解细胞壁后), 首先在强去污剂作用下裂解细胞释放出基因组 DNA, 接着加入 RNase A 去除 RNA, 然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白, 最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

【产品特点】

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂。
2. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 结果稳定, 产量高, OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9, 长度可达 50 kb -150kb, 可直接用于构建文库, PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

【产品组份】

试剂盒组成	保存	20T
细胞核裂解液	室温	180ml
蛋白沉淀液	室温	60ml
DNA 溶解液	室温	10ml
RNase A(10mg/ml)	-20℃	500μl

1. 环境温度低时细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出出现浑浊或者沉淀, 可在 37℃水浴加热几分钟, 轻轻旋摇, 即可恢复澄清, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。
2. 蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀, 可以在 37℃水浴几分钟帮助重新溶解, 如果不能完全溶解, 也不影响使用效果, 直接取用上层溶液即可。
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。

【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 3,000xg, 可容纳 50ml 离心管的台式离心机。可以根据实验室设备条件来调整转速, 如果有高速离心机, 可以提高转速。如果没有高速离心机, 可以适当延长离心时间, 以去除蛋白杂质。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、0.5M EDTA 和 Lysozyme (溶菌酶) (用于革兰氏阳性菌)、lysostaphin(用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)、水浴箱。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。
4. 本试剂盒为溶液型, 可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的细菌细胞量, 请联系我们索取其它处理量的操作手册。

【操作步骤】

1. 收集 10 毫升过夜培养细菌加入 15 毫升离心管。
2. 2,000xg 离心 3 分钟，使细胞沉淀下来，弃上清，涡旋或轻弹打散细胞沉淀。对革兰氏阳性菌，接步骤 3。对革兰氏阴性菌，直接接步骤 6。
3. 加入 4.8ml 50mM EDTA (PH 8.0) 完全重悬细胞。
4. 加入 1.2ml 溶菌酶(20mg/ml)，混匀。

对于大部分的革兰氏阳性菌如 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous* 和 *Brevibacterium albidum*, 使用溶菌酶就可以有效裂解。但是对于某些种类的 *Staphylococcus*, 则应该加入 60 μ l 溶菌酶(20mg/ml)和 60 μ l lysostaphin (20mg/ml)确保有效裂解。

5. 37°C 温育 30-60 分钟。2,000xg 离心 10 分钟，弃上清，吹打涡旋打散细胞沉淀。
6. 加入 9ml 细胞核裂解液至打散的细胞，轻柔吹打裂解细胞。
7. 80°C 温育 5 分钟裂解细胞，然后冷却至室温。
8. 加入 18 μ l RNase A (10mg/ml) 至裂解物中至终浓度 20 μ g/ml。颠倒混匀后 37°C 温育 15-60 分钟去除残留 RNA。然后室温冷却至少 5 分钟使回复到室温。
9. 在回复到室温的裂解物内加入 3ml 蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴 5 分钟。

由于样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA。如果用手振荡混匀，则不可以用手上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA；但是力度也不能小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开，离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分，最后的产物污染有大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器。

10. 5,000xg(可根据需要调整加大离心力)离心 10 分钟。这时应该可以见到管底蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。
11. 小心吸取上清到一个新的 50ml 离心管中。

吸取上清时小心不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀，如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 5 分钟后取上清。

12. 加入等体积的室温异丙醇（约 9ml），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

注意有时候棉絮状（丝状）DNA 颠倒混匀的时候，粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 13，直接 2,000xg 离心 5 分钟，弃上清，然后接步骤 15。

13. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。
14. 加入 9ml 70% 乙醇后，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 离心 3-5 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。
15. 加入 5ml 70% 乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000xg 离心 1 分钟，倒去上清（注意不要把 DNA 沉淀倒掉了），倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇，还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

注意不要干燥过头，否则 DNA 极其难溶；也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

16. 加入 500 μ l DNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65°C 温育 30-60 分钟（不要超过一小时），中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4°C 放置过夜来重新水化 DNA，中间不时颠倒轻弹帮助溶解。
17. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C。

【问题与解决方法】

问题	评论与建议
	*使用了不恰当的裂解液，造成裂解不完全-建议：处理材料不要过量。 *有的革兰氏阳性菌裂解比较困难-建议：按照步骤 4 使用 lysostaphin 帮助裂解。
DNA 产量低	*加入蛋白沉淀液后没有充分混匀，DNA 和蛋白质沉淀不能分离开，离心时丢失-建议：参见步骤 9 保证充分混匀。 * DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了-建议：异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中，倒弃上清的时候要格外小心，不要把 DNA 沉淀也倒掉了。
A260/A280>1.9	* RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染-建议：可以加大 RNA 酶用量或者处理时间延长到 1 小时。 * DNA 剪切断了-建议：严格按照操作步骤，动作不可以太剧烈。
A260/A280 <1.6	*蛋白质残留高-建议：保证重复的裂解液用量和时间；看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的评论与建议，确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 11，防止蛋白污染。 *测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-建议：使用 TE 缓冲液来稀释 DNA，保证 pH 值大于 8.0。 * DNA 没有完全溶解-建议：可在 65℃温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4℃放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。
变色的 DNA	*如果异丙醇沉淀后没有迅速进行 70%乙醇漂洗的步骤，有的组织如肝脏提取出的 DNA 可能会变色-建议：异丙醇沉淀离心后，马上进行 70%乙醇清洗的步骤。
DNA 长度 小于 20kb	*样品太旧或者不正确的存放，反复冻融等，造成 DNA 降解-建议：选用新鲜的样品。 *操作不当，造成对基因组 DNA 的剪切-建议：混匀轻柔，不可以用手剧烈振荡离心管，选用大口径的枪头转移或者混匀 DNA。
未见到蛋白沉淀	*加入蛋白沉淀液前，裂解混合物没有冷却回室温-建议：冷却至室温或者冰上放置 5 分钟后再加入蛋白沉淀液。 *蛋白沉淀液没有和裂解混合物充分混匀-建议：应该连续高速涡旋振荡混匀 25 秒，涡旋并不会剪切断 DNA。 *加入蛋白沉淀液后，混合物没有在冰上放 5 分钟-建议：离心前在冰上放置 5 分钟帮助沉淀。
DNA 沉淀难以 重新溶解水化	*晾干 DNA 沉淀时过度了-建议：晾干时密切观察，不要干燥过头，注意应该观察管底的 DNA 沉淀，有时候管壁上的残留乙醇已经挥发，但留下一些水分还没有干，只要管底 DNA 干了就可以加入 DNA 溶解液。可在 65℃温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4℃放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。
下游酶切不开 或者 PCR 反应受抑 制	* DNA 未干燥完全，残留乙醇太多-建议：敞开离心管口，在 65℃温育几分钟，让乙醇挥发。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。