

A&DSim 细菌 DNA 提取试剂盒说明书

产品组成

A&DSim 细菌 DNA 提取试剂盒 Cat. No.	5 次样品 A-3302005	50 次制备 A-3302050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
溶菌酶	60 mg	600 mg
Buffer L1	2 ml	14 ml
Buffer L2	2 ml	14 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml
Buffer WB（浓缩液）	1.5 ml	9.5 ml
Buffer TE	2.5 ml	25 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

溶菌酶请置于 2~8℃ 贮存。

其他物品如果储存于室温（15~25℃），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℃，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

艾德科技（北京）有限公司研发部：e-mail: tech@aderr.com 电话：010-57225208。

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. 台式少量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
5. 水浴锅和旋涡震荡器

使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
- 2) 将水浴锅温度设置到 37℃，并将 Buffer TE 温育至 37℃。
- 3) 根据一次提取的细菌标本数（按每个标本需加 100 μl 溶菌酶溶液计算）配制适量的 100mg/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 65mg 溶菌酶干粉，加入 650 μl 去离子纯水配制成 650 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℃ 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作好“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 μ l Buffer TE，旋涡震荡充分悬浮细菌。

* 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1ml蒸馏水，旋涡震荡悬浮细菌后12000 rpm离心30秒，弃蒸馏水上清，再加入200 μ l Buffer TE，旋涡震荡充分悬浮细菌。

* 细菌收集方法：

a) 悬浮培养的细菌：12000rpm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1.5ml离心管中加入200 μ l Buffer TE, 用接种环刮取菌落，将细菌洗脱在Buffer TE 中。

2. 加入100 μ l溶菌酶溶液，旋涡振荡约15秒混匀，37 $^{\circ}$ C水浴30-60分钟。

* 大部分细菌水浴30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）需要处理1-2小时才能完全破壁。请根据不同类别的细菌适当调整水浴时间。

3. 加入225 μ l Buffer L1，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 μ l RNase A 储存液（100 mg/ml，本试剂盒不提供）。

4. 加入225 μ l Buffer L2，剧烈摇晃离心管3~5次，再旋涡振荡30秒混匀。

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2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

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

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

* 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 2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

8. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l 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 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 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 2ml 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 μ l 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C备用。