

# 细菌基因组 DNA 提取试剂盒

## GV-Bacterial Genomic DNA Extraction Kit

Cat #: GV-B-DNA-50/ GV-B-DNA-100

产品规格: 50T/100T

保存与运输: 收到试剂盒, 请按照标签要求与相应条件保存。

本试剂盒采用裂解液和酶相结合的方法裂解细菌, 具有效率高、速度快等特点。本试剂盒适用于各种细菌基因组 DNA 的提取。细菌被裂解经蛋白酶 K 消化后, 经特异性结合 DNA 的离心柱吸附和独特的缓冲液系统提取纯化得基因组 DNA。提取的基因组 DNA 可以直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

### 三、试剂盒组成、储存、稳定性

成分	50T	100T	注意事项
RNase A	0.5 ml	1ml	-20℃
Proteinase K	1ml	2ml	-20℃
Buffer GB1	35ml	70ml	
Buffer GB2	25ml	50ml	
Buffer BL	13ml	26ml	
Buffer WB1	24ml	48ml	Add 16ml(50T)/32ml(100T) ethanol
Buffer WB2	16ml	2×16ml	Add 64ml ethanol
Elution	10ml	20ml	For DNA Elute
Spin Columns	50	100	Max adsorption up to 20µg each
1.5ml Tubes	50	100	
Handbook	1	1	

RNase A: -20℃保存。

Proteinase K: -20℃保存。

Buffer GB1: 裂解液, 室温低时可能有沉淀, 37-65℃水浴溶解。

Buffer GB2: 裂解液, 室温密闭贮存。

Buffer BL: 平衡液, 平衡液的加入能够激活硅基质膜, 改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 专一吸附 DNA 的作用, 同时还可消除高温潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

Buffer WB1: 洗涤液, 使用前按照试剂瓶上指定加入无水乙醇, 室温密闭贮存。

Buffer WB2: 去盐液, 使用前按照试剂瓶上指定加入无水乙醇, 室温密闭贮存。

Elution: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

### 一、注意事项

- 1、DNA 呈酸性, 建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存。
- 2、用平衡液处理过的柱子最好当天使用, 放置时间过长会影响效果。
- 3、Buffer GB1、Buffer GB2 和 Buffer BL 含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

### 二、实验前试剂准备

- 1、使用前 Buffer WB1 和 Buffer WB2 中按照试剂瓶上指定量加入无水乙醇。
- 2、检查 Buffer GB1 是否出现沉淀, 若有沉淀, 应于 37-65℃温浴溶解后再使用。
- 3、将 Elution 或双蒸水 37-65℃预热, 有利于提高洗脱效率。
- 4、离心柱预处理: 在离心柱中加入 200ul Buffer BL, 12000rpm 离心 1min, 去掉收集管中的平衡液。

#### 四、操作步骤

- 1、取菌液 0.6~3.0 ml (约  $1\sim 5\times 10^6$  个细菌), 12,000 rpm 离心 1 min, 去上清。
- 2、加入 600  $\mu$ l Buffer GB1, 漩涡振荡, 加入 20  $\mu$ l Proteinase K, 60  $^{\circ}$ C 水浴 45 min~1 h, 其间颠倒混匀数次。  
如需消化 RNA, 可加入 10  $\mu$ l RNase A, 充分混匀, 室温放置 10 min。  
若加入细菌较多, 可适当延长水浴时间, 适量增加 Proteinase K 的量, 按比例增加 Buffer GB1 和 Buffer GB2 的量。此步骤可以过夜处理。
- 3、加入 400  $\mu$ l Buffer GB2, 混匀。
- 4、离心 10 min, 将上清倒入离心柱中, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
- 5、加入 700 $\mu$ l Buffer WG1(使用前加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30s~1min, 弃废液。
- 6、加入 700 $\mu$ l Buffer WG2(使用前加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30s~1min, 弃废液。
- 7、加入 500 $\mu$ l Buffer WG2, 12,000 rpm 离心 30 s~1 min, 弃废液。
- 8、再次 12,000 rpm 离心 2min, 将离心柱置于新的离心管中, 并打开离心柱盖, 于室温或 37 $^{\circ}$ C 恒温箱放置 5~10 min 直至无明显乙醇味。
- 9、在离心柱中央加入 50-200 $\mu$ l Elution(37-65 $^{\circ}$ C 预热), 室温放置 2~5min, 12,000 rpm 离心 2min。
- 10、离心得到的溶液再次加入离心柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min。所得的溶液为纯化后的 DNA。

#### 五、纯化效果检测

- 1、DNA 提取后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测完整性、浓度和纯度。
- 2、DNA 在 260nm 处有吸收峰, 检测时应该使 OD<sub>260</sub> 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD<sub>260</sub> 为 1 时大概相当于 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA, 40 $\mu$ g/ml 单链 DNA。
- 3、核酸浓度 ( $\mu$ g/ml) =OD<sub>260</sub> $\times$ 50 $\times$ 稀释倍数。
- 4、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值应该为 1.7~2.0。

#### 六、常见问题分析及建议

- 1、柱子堵塞。
  - 1) 裂解消化不充分: 适当延长 Proteinase K 消化时间, 可过夜消化。
  - 2) 样品过多: 样品量不要超过说明书所定最大量; 可适当增加 Proteinase K 的量。
- 2、DNA 产量低。
  - 1) 柱子堵塞: 加大转速和延长离心时间。
  - 2) Buffer WB1、Buffer WB2 没有加无水乙醇: 按说明书加入无水乙醇。
  - 3) 样品裂解不完全: 适当延长裂解时间。
  - 4) 样品不够新鲜: 尽量使用新鲜样品。
  - 5) 洗脱效率低: 洗脱液使用前可 37-65 $^{\circ}$ C 预热, 自备洗脱液 pH 值不合适, 应保证在 7.5-8.5。
- 3、DNA 纯度低。
  - 1) 消化不完全: 样品量不要超过规定范围; 延长消化时间, 使样品充分消化。
  - 2) 洗涤不当: 严格按照说明书步骤洗脱。
  - 3) 乙醇未除干净: 适当延长晾干时间, 使乙醇充分挥发。