

Version: AA 4.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Bacteria DNA Kit

细菌基因组DNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AA0201、AA0202

01/产品组分

序号	组分	50 次	200 次	50 次	200 次
		AA0201-A	AA0201-B	AA0202-A	AA0202-B
1	平衡液	5 mL	20 mL	5 mL	20 mL
2	缓冲液 RB	30 mL	120 mL	30 mL	120 mL
3	结合液 CB	11 mL	40 mL	11 mL	40 mL
4	抑制物去除液 IR	25 mL	100 mL	25 mL	100 mL
5	漂洗液 WB	15 mL	25 mL×2	15 mL	25 mL×2
		第一次使用前按如下标注加指定量无水乙醇			
		60 mL	100 mL×2	60 mL	100 mL×2
6	洗脱缓冲液 EB	15 mL	40 mL	15 mL	40 mL
7	蛋白酶 K 溶液 (20 mg/mL)	-	-	1 mL	1 mL×4
8	吸附柱 AC	50 个	200 个	50 个	200 个
9	收集管 (2 mL)	50 个	200 个	50 个	200 个

02/保存条件

蛋白酶 K 溶液于-20 °C保存; 其它组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

本试剂盒适用于快速提取各种细菌基因组 DNA, 可在 30 min 内完成单个或多个样本的提取工作。基于独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶, 基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗、离心等步骤, 进一步将蛋白、多糖、多酚以及细胞代谢物等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

不同样本提取 DNA 的大致产量与纯度如下:

样本类型	样本量	DNA 平均产量	纯度 (OD260/OD280)
革兰氏阴性菌 (如大肠杆菌)	2×10^8 cell/mL	15-20 μg	1.7-1.9
革兰氏阳性菌 (如表皮葡萄球菌)	3.5×10^8 cell/mL	6-13 μg	1.7-1.9

04/自备材料

异丙醇、无水乙醇、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）、RNase A

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

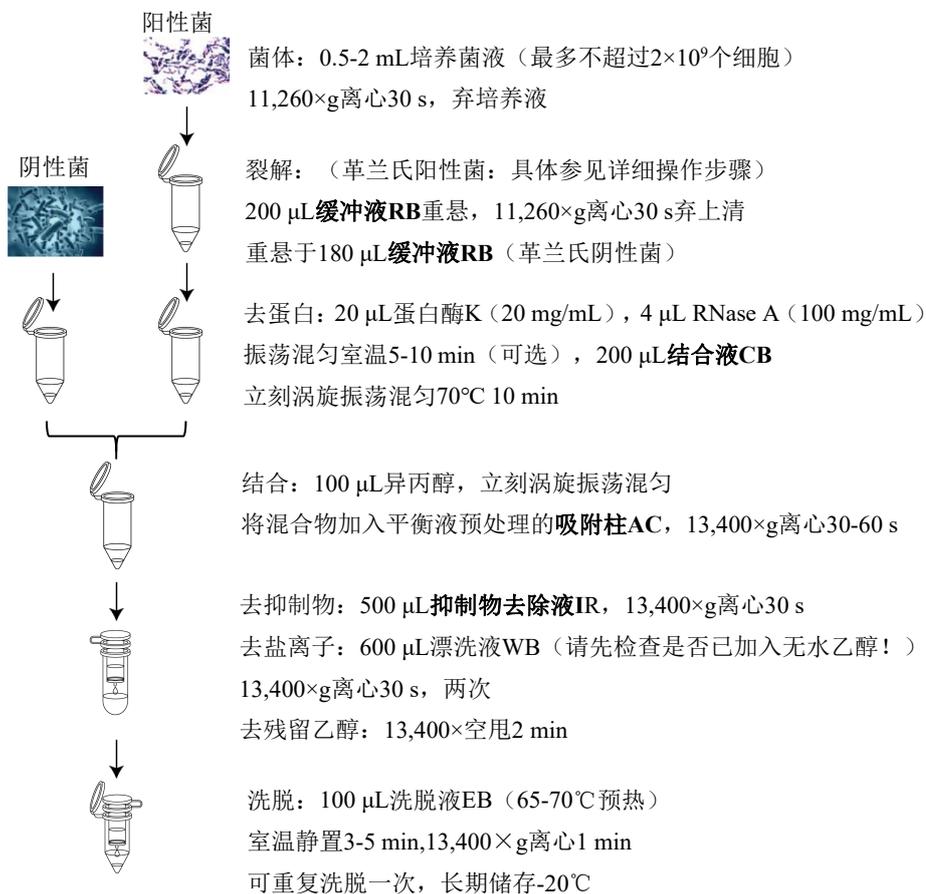
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却至室温即可使用。
- ◇ 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 首次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 关于平衡液的使用：取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管中，取 100 μL 的平衡液至柱中。12,000 rpm（13,400 \times g）离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管。此时平衡液预处理柱完毕。平衡液在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C 使沉淀完全消失。

06/使用方案

1. 取 0.5-2 mL 培养菌液（最多不超过 2×10^9 个细胞），10,000 rpm（11,260 \times g），离心 30 s，尽可能的吸弃上清，收集菌体。
 - ▲ 起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整，但是离心吸附柱最大吸附能力是 20 μg 基因组 DNA，如果菌体过量超过最大吸附能力，反而会严重降低产量。
2. 加入 200 μL 缓冲液 RB 重悬，10,000 rpm（11,260 \times g）离心 30 s，弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 180 μL 缓冲液 RB 中。
 - ▲ 注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过第 2 步骤，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入 180 μL 缓冲液（20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶；溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制，否则会导致溶菌酶无活性），37°C 处理 30 min 以上。

3. 加入20 μL 蛋白酶K (20 mg/mL) 溶液, 充分混匀, 再加入200 μL 结合液CB, 立刻涡旋振荡充分混匀, 在70°C放置10 min.
 - ▲可选步骤: 如果RNA残留较多, 需要去除RNA, 可以在加入200 μL 结合液CB前加4 μL RNase A (100 mg/mL) 溶液, 振荡混匀, 室温放置5-10 min.
4. 冷却后加入100 μL 异丙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀.
 - ▲上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量, 必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15 s混匀。
5. 将上一步混合物 (包括可能有的沉淀) 加入用平衡液预处理过的吸附柱AC中, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心30-60 s, 倒掉收集管中的废液。
6. 加入500 μL 抑制物去除液IR, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心30 s, 弃废液。
7. 加入600 μL 漂洗液WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心30 s, 弃废液, 重复该步骤一遍。
8. 将吸附柱AC放回空收集管中, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加100 μL 洗脱缓冲液EB (事先在65-70°C水浴中预热效果更好), 室温放置3-5 min, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心1 min. 将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置2 min, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心1 min.
 - ▲洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要DNA浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于30 μL , 体积过小降低DNA洗脱效率, 减少DNA产量。
10. DNA可以存放在2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在-20°C。

07/流程简图



08/相关产品

- AA1904-A RNase A (10 mg/mL)
- AA1905-A 溶菌酶 (100 mg/mL)
- AA1906 蛋白酶 K (10 mg/mL)
- AC0401 SPARKeasy 细菌 RNA 快速提取试剂盒
- AC0402 SPARKeasy 改良型细菌 RNA 快速提取试剂盒
- AC0101 SparkZol Reagent
- AF0802 2×SparkHiFi Max Master Mix (with dye)
- AF0803 2×SparkHiFi Max Master Mix (without dye)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

