

Version: AA 5.0 (2024.02.22修订)

SPARKclassic Bacteria DNA Kit

细菌基因组DNA提取试剂盒

(溶液型)

目录号: AA0203

01/产品组分

序号	组分	20 次 AA0203-A	50 次 AA0203-B
1	细胞核裂解液	90 mL×2	225 mL×2
2	蛋白沉淀液	60 mL	150 mL
3	DNA 溶解液	10 mL	20 mL
4	RNase A (10 mg/mL)	500 µL	1 mL

02/保存条件

RNase A 于-20°C保存, 其它组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

本试剂盒用于各种细菌基因组 DNA 的快速提取, 可在 1 h 内完成单个或多个样本的提取工作。细菌样品中加入细胞核裂解液 (或者通过溶菌酶或者其它一些酶帮助裂解细胞壁后), 在强去污剂作用下裂解细胞释放出基因组 DNA, 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新溶解于 DNA 溶解液中。

04/自备材料

异丙醇、70%乙醇、0.5 M EDTA、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)

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

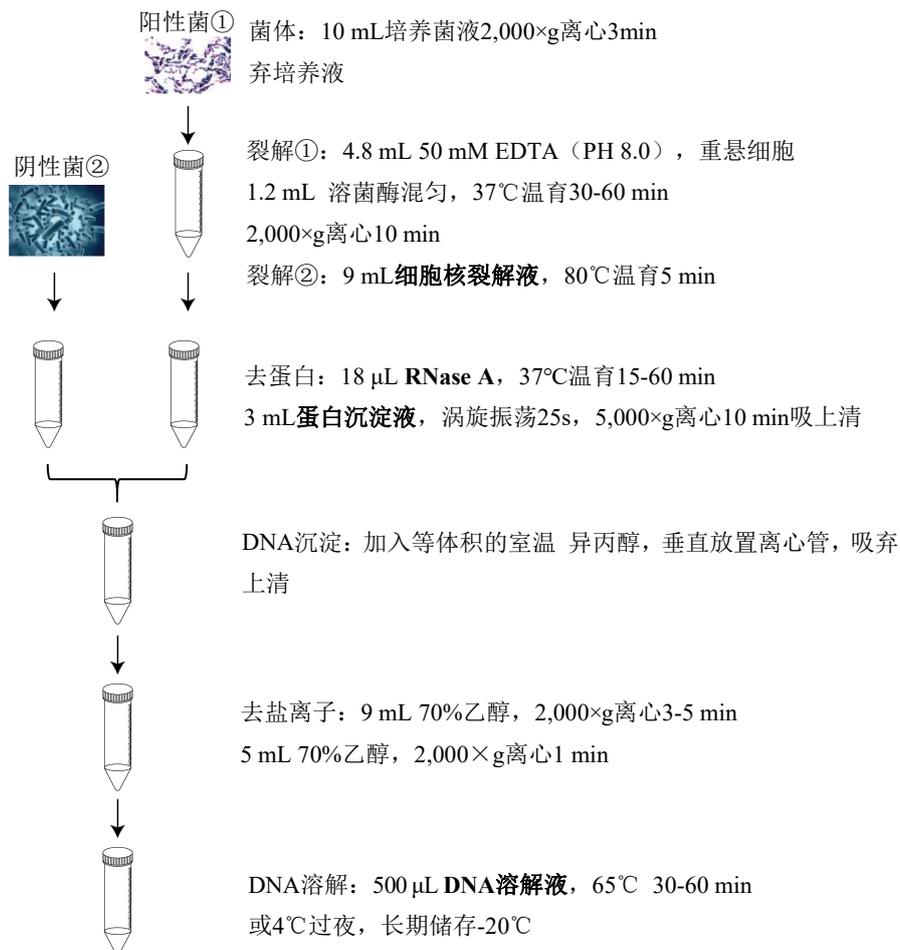
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热到 37℃或者 70℃备用。
- ◇ 环境温度低时细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃水浴加热帮助恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- ◇ 蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀，可以在 37℃水浴几分钟帮助重新溶解，如果不能完全溶解，也不影响使用效果，直接取上层溶液即可。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。

06/使用方案

1. 用15 mL离心管收集10 mL过夜培养细菌。
2. 2,000×g离心3 min，沉淀菌体，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4.8 mL 50 mM EDTA（PH 8.0）使细胞重悬。
4. 加入1.2 mL溶菌酶（20 mg/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 μL溶菌酶（20 mg/mL）和60 μL lysostaphin（20 mg/mL）确保有效裂解。
5. 37℃温育30-60 min，2,000×g离心10 min，弃上清，吹打涡旋打散细胞沉淀。
6. 加入9 mL细胞核裂解液至打散的细胞，轻柔吹打裂解细胞。
7. 80℃温育5 min裂解细胞，冷却至室温。
8. 加入18 μL RNase A（10 mg/mL）至裂解物中至终浓度20 μg/mL。颠倒混匀后37℃温育15-60 min去除残留RNA。然后室温冷却至少5 min使恢复到室温。
9. 在恢复到室温的裂解物内加入3 mL蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀25 s。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴5 min。
 - ▲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。
10. 5,000×g（可根据需要调整加大离心力）离心10 min。此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. 小心取上清到一个新的50 mL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 min后取上清。

12. 加入等体积的室温异丙醇（约9 mL），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，粘附着在管盖或者管口处，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2,000×g离心5 min，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9 mL 70%乙醇后，颠倒几次漂洗DNA沉淀，2,000×g离心3-5 min，在管底可以见到白色的DNA沉淀块，倒弃上清。
15. 加入5 mL 70%乙醇，颠倒几次漂洗DNA沉淀，2,000×g离心1 min，弃上清（注意不要把DNA沉淀倒掉），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反应（如酶切）。
16. 加入500 μL 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 min（不要超过1 h），期间不时的轻弹管壁帮助重新水化DNA。也可在室温或者4°C放置过夜来重新水化DNA。
17. DNA可以存放在2-8°C，如果长时间存放，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)
- 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
- AA1906 蛋白酶 K (10 mg/mL)
- 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

