



细菌基因组 DNA 提取试剂盒

Bacteria genomic DNA Isolation Kit

MKC101

使用说明书

目 录

1 产品概述.....	01
2 产品组分.....	01
3 注意事项	01
4 实验流程	02
5 常见问题及解决方案.....	04

1 产品概述

本试剂盒适用于从各种来源的细菌（革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌）中提取基因组 DNA。试剂盒基于硅基质的膜纯吸附纯化技术。是以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质，根据该膜在高浓度离盐液存在时特异性的吸附核酸（蛋白质或其它杂质不被吸附而去除），低浓度盐离子存在时核酸能被洗脱的特性而开发的产品。提取过程中无需使用酚氯仿等有毒试剂，整个提取过程在 0.5-1h 内即可完成，并最大限度的去除 RNA、杂蛋白、脂类及其他抑制性杂质。提取的基因组 DNA 纯度高，质量稳定，可用于酶切、PCR、Southern 杂交等下游实验。

2 产品组成

	组分 (MKC101)	50T	储存条件
I	Buffer GB-S	12.5 mL	室温运输 15 ~ 25°C 保存
	Buffer GB-L	15 mL	
	Buffer GB-C	13 mL	
	Buffer GW	8 mL	
	Buffer GE	10 mL	
II	蛋白酶 K (20 mg/mL)	1.1 mL	室温运输
	溶菌酶 (100 mg/mL)	1 mL	4~8°C 保存
	RNase A (50 mg/mL)	200 μL	-20°C 长期保存
III	吸附柱 (DNA Mini Columns)	50 个	室温运输
	收集管 (Collection Tubes)	50 个	15 ~ 25°C 保存

试剂盒于常温（15-25°C）运输，除 II 类酶类试剂外，I 类试剂 和 III 类耗材皆可室温保存；

3 注意事项

1) **样品量**：处理量不宜超过试剂盒兼容范围（ $<2 \times 10^9$ 个革兰氏阴性菌， $<1 \times 10^8$ 个革兰氏阳性菌），过多的样本量可使裂解不完全，导致 DNA 提取量下降。同时，样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。

2) **自备材料**：需要自备的试剂、耗材及仪器主要包括：无水乙醇，1.5 ml 离心管，离心机（转速 ≥ 12000 rpm）、水浴锅或金属浴。

3) **使用前准备**：首次使用试剂盒前，请参考瓶上标签，在 Buffer GB-C 和 Buffer GW 中加入对应量的无水乙醇，混匀后方可使用。使用前先检查 Buffer GB-S 或 Buffer GB-L 中是

否有沉淀析出，若有沉淀析出，可在 37°C 水浴中重新溶解，混匀后方可使用。

4) **酶制剂使用和保存：**试剂盒中酶类试剂（如蛋白酶 K，溶菌酶，和 RNase A），可在 4 度冰箱保存使用；长期不用时，请放置在 -20 度冰箱保存，但应避免多次反复冻融。通常未开封的酶类试剂低温可保存 12 个月；但开封后的酶制剂，建议在 6 个月内使用。

5) **安全提醒：**所有操作步骤，均在室温（15 ~ 25°C）进行。操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免试剂沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

6) **产量范围：**本试剂盒使用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌标准菌株为材料获得基因组 DNA 的产量范围参考下表。

菌株	总量	产量
<i>Escherichia coli</i>	1.0×10^9 CFU	30-40 μ g
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0×10^8 CFU	5-15 μ g

注：革兰氏阳性细菌因细胞壁裂解困难的原因，产量明显下降，革兰氏阳性细菌的产量与大肠杆菌产量范围相似。基因组 DNA 的产量，受到细菌种类、细胞壁组分的差异、收集菌体的量、操作熟练程度等因素的影响。

4 实验流程

样品制备：

取 0.5-1mL 的细菌培养物（阴性菌 $< 1.0 \times 10^9$ CFU，阳性菌 $< 1 \times 10^8$ CFU）至离心管中，12000rpm（或 13,500 rcf）离心 2min，弃上清，收集菌体。

菌体裂解：

阴性菌：

- 1) 向菌体沉淀中加入 230 μ L Buffer GB-S，吹吸混匀。
- 2) 向离心管中加入 20 μ L 蛋白酶 K 溶液，吹吸混匀。
- 3) 向离心管中加入 250 μ L Buffer GB-L，充分吹吸混匀，金属浴或者水浴锅中 70°C 放 10min，溶液应变清亮^{*1}。
- 4) （可选）向离心管中加入 4 μ L RNase A，室温放置 5 min^{*2}。

阳性菌：

- 1) 向菌体沉淀中加入 180 μ L Buffer GB-S 溶液，吹吸混匀；再加入 40 μ L 溶菌酶溶液，吹吸混匀；将离心管置于水浴锅中，37°C 处理 30min 以上。

注意：大部分细菌水浴 30 min 后可充分破壁，但是某些细胞壁较厚的细菌（比如金黄色葡萄球菌）需要延长至 1 h 以增加破壁效率。应根据不同类别的细菌，适当调整水浴时间。



- 2) 向离心管中加入 20 μ L 蛋白酶 K 溶液，吹吸混匀。
- 3) 向离心管中加入 250 μ L Buffer GB-L，充分吹吸混匀，金属浴或者水浴锅中 70℃放置 10min，溶液应变清亮^{*1}。
- 4) (可选) 向离心管中加入 4 μ L RNase A，室温放置 5min^{*2}。

^{*1}: 加入缓冲液 GB-L 时可能会产生白色沉淀，一般 70℃放置时会消失，不会影响后续实验。如 70℃放置 10min 后溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。

^{*2}: 若菌量偏大，或需要去除干净 RNA，可延长室温放置时间至 10–15min。

过柱洗涤:

- 1) 向装有完成菌体裂解的离心管中加入 200 μ L 无水乙醇，充分吹吸混匀后再颠倒混匀几次，简短离心以收集管盖和内壁的液体。
- 2) 将吸附柱放入收集管中，将离心管内的液体和絮状沉淀都转移到吸附柱里，12000rpm (或 13,500 rcf) 离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。此时 DNA 已结合在吸附柱上。
- 3) 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GB-C，12000rpm (或 13,500rcf) 离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。
- 4) 向吸附柱中加入 650 μ L Buffer GW，12000rpm (或 13,500rcf) 离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。

DNA 洗脱

- 1) 将装有吸附柱的收集管置于离心机中，12000rpm (或离心机最高转速) 离心 2min，倒掉废液，将吸附柱开盖，于室温放置数分钟，以彻底晾干漂洗液。

注：这一步的目的是将吸附柱中残余漂洗液去除，避免漂洗液中乙醇的残留影响后续的实验如酶切、PCR 等实验。

- 2) 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30–100 μ L Buffer GE，室温放置 2–5 min，12,000 rpm (或 13,500rcf) 离心 1 min，将溶液收集到离心管中。

注：为增加基因组 DNA 的得率，可将 Buffer GE 预热至 50℃再添加至吸附柱膜中间；或将离心得到的 DNA 洗脱液再次加入吸附柱膜上，室温放置 2 min，12,000 rpm (或 13,500 rcf) 离心 1 min。

- 3) 丢弃吸附柱，并收集洗脱后的 DNA 溶液。DNA 溶液短期保存在 2–8℃，长期保存需保存于 -20℃。

5 常见问题及解决方案

该列表列举了提取过程中可能碰到的问题以及解决方案。若有未涉及的问题，可联系技术人员提供帮助。



问题	原因	解决方案
柱子堵塞	存在不消化的物质	在 70℃放置 10min 后若仍存在明显的颗粒，于 12000 rpm 离心 2min 去除未消化的物质。
	样品用量过多	减少样品用量
	样品用量太低	适当加大样品用量
	柱子堵塞	参照上述解决方案
DNA 产量低	未加 200 μ L 无水乙醇，或加的量不够，再或者加入后没有充分吹洗混匀	在将离心管内液体转移到吸附柱中之前要加 200 μ L 无水乙醇，并充分吹吸混匀。
	Buffer GB-C、Buffer GW 中没有加入乙醇或加入量不够	按说明书或标签所示，加入相应的无水乙醇到 Buffer GB-C、Buffer GW 中。
	吸附柱没有空甩	在用 Buffer GW 漂洗过后，要将吸附柱装回收集管中，12000rpm（或 13,500 rcf）离心 2min，并将吸附柱于室温放置数分钟以晾干漂洗液。
	洗脱效率不够	增加洗脱体积或洗脱次数。
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 比值不正常	蛋白酶 K 或溶菌酶活性下降	蛋白酶 K、溶菌酶溶液长期保存时应置于-20℃，且避免反复冻融。
	蛋白酶 K 活性下降	蛋白酶 K 长期保存时应置于-20℃，且避免反复冻融。
	RNA 污染	加入 RNase A 消化 RNA 或延长 RNase A 的作用时间
	盐污染	确保所用的离心管干净无菌；确保 Buffer GE 没有被污染；确保用 650 μ L Buffer GW 漂洗过吸附柱。
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ 比值不正常	有机溶剂污染	没有空甩吸附柱会造成乙醇残留，确保在漂洗过后空甩吸附柱（12000rpm 或离心机最高转速，离心 2min）。