



## Bacterial DNA Isolation Kit

Cat.No.DE-05311

For purification of total DNA from bacteria using  $\leq 3$  mL culture medium  
(maximum  $1 \times 10^9$  cells)

For research use only

Store at room temperature



## 目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
基因组 DNA 的应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
产品信息	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
DNA-Only Column 特性	6
基因组 DNA 提取得率和纯度	7
基因组 DNA 片段大小	7
注意事项	9
操作前准备事项	9
实验材料和设备	9
Lysozyme 溶液配制	9
安全性	9
操作指南	10
● 操作步骤	10
DNA 浓度及纯度测定	11
快速操作示意图	12
问题分析指南	13

## 产品介绍

本试剂盒提供了从各种来源的细菌(革兰氏阴性和革兰氏阳性)培养液中快速简便的提取基因组 DNA 的方法；一次可处理小于 3 mL 处于对数生长期的细菌培养液( $1 \times 10^9$  细菌)。试剂盒搭配高效的 Foregene Protease，使得可以在 1 小时内提取到 15-50  $\mu\text{g}$  高质量的基因组 DNA。此外，该试剂盒还可以抽提得到除基因组以外的遗传物质，如质粒，Cosmid，BAC 等。

离心柱中采用的 DNA-only 硅胶基质材料为本公司特有的新型材料，能高效、特异的吸附 DNA，对 DNA 的最大吸附量为 80  $\mu\text{g}$ ，独特的缓冲、洗脱体系可最大限度的去除 RNA、杂质蛋白、离子及细胞中其他有机化合物。提取得到的基因组 DNA 片段大、纯度高、质量稳定可靠，DNA 片段大小稳定在 23 kb 左右。

## 产品特点

- ◆ 无 RNA 酶污染：无需额外添加 RNA 酶即可去除基因组 DNA 中的 RNA，避免实验室遭受外源 RNA 酶污染。
- ◆ 速度快：Foregene Protease 具有比同类蛋白酶更高的活性，能在短时间内消化破壁细菌样本。
- ◆ 方便：离心操作均在常温，无需  $4^\circ\text{C}$  低温离心或乙醇沉淀 DNA。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取获得的基因组 DNA 片段大、无 RNA、无 RNA 酶、离子含量极低，能满足各种实验的要求。

## 试剂盒应用

该试剂盒适用于纯化以下样本基因组 DNA：处于对数生长期的革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌。

## 基因组 DNA 的应用

细菌基因组 DNA 提取试剂盒纯化获得的基因组 DNA 纯度高，可用于常规分子生物学操作，如：酶切、PCR、Southern 杂交、文库构建等实验。

## 产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的细菌基因组 DNA 提取试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

## 试剂盒内容

Bacterial DNA Isolation Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒	
试剂盒组成	DE-05311
	50 T
Buffer ML1	20 mL
Buffer ML2	20 mL
Buffer PW	25 mL
Buffer WB	25 mL
Buffer EB	18 mL
Foregene Protease	1 mL
Lysozyme	250 mg
Buffer TE	2.5 mL
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

## 产品信息

型号	离心柱型	纯化组件	Foregene 离心柱、试剂
通量	1-24 个样品	制备时间	~60 min(24 个样品)
离心机	台式离心机	细菌裂解物分离	离心分离
离心柱液体盛装量	800 $\mu$ L	纯化柱 DNA 承载量	80 $\mu$ g
洗脱体积	100-200 $\mu$ L	细菌处理量	$\leq$ 3 mL(培养 16-20hr 细菌)

## 储存条件

- ◆ 本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下, 可保存 24 个月; 如需保存更长时间可置于 2–8°C。

注意: 若低温保存, 溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟, 以溶解沉淀, 混匀后再使用。

- ◆ Foregene Protease 溶液具有独特配方，常温保存长期(3个月)具有活性；在 4°C 保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4°C 保存，切记不能置于 -20°C 保存。
- ◆ Lysozyme 为干粉状粉末，2-8°C 保存长期(3个月)具有活性，更长时间的保存，请置于 -20°C。

## 试剂盒组分信息

- ◆ Buffer ML1：提供细菌裂解环境。
- ◆ Foregene Protease：在 Buffer ML1 的环境下酶解细菌样本。
- ◆ Lysozyme：消化革兰氏阳性菌细胞壁。
- ◆ Buffer ML2：失活 Foregene Protease，并提供 DNA 上柱环境。
- ◆ Buffer PW：去除 DNA 中的蛋白质、RNA 等杂质。
- ◆ Buffer WB：去除 DNA 中的残留的盐离子。
- ◆ Buffer EB：洗脱纯化柱膜上的 DNA。
- ◆ Buffer TE：用于配制 100 mg/mL Lysozyme 的溶液
- ◆ DNA-only Column：特异吸附裂解产物中的 DNA。

## DNA-Only Column 特性

DNA最大结合能力(Maximum binding capacity)	80 µg
上清最大载量体积(Maximum loading volume)	800 µL
最大DNA片段(Longset DNA fragment)	23 kb
最小洗脱体积(Minimum elution volume) *	100 µL
最佳样本选取(Selection of samples)	培养16-20 hr的阴性菌
样本最大初始量(Maximum amount of starting material)	3 mL

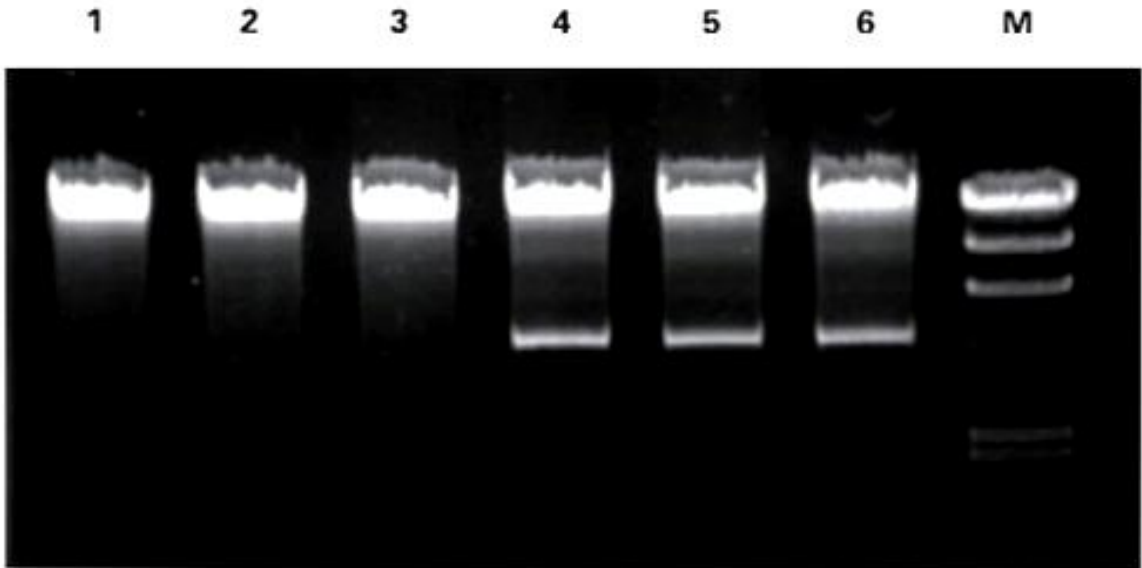
\*: 100 µL 的最小洗脱体系是在兼顾 DNA 回收率及浓度给出的比较合理的建议体积。如果为了提高 DNA 的产量，可以适当增加洗脱液体积；如果为了提高纯化得到的 DNA 浓度，在牺牲部分 DNA 得率的前提下，适当的减少洗脱液体积，比如采用 50 µL 的洗脱体系，以期得到更高浓度的 DNA。

## 基因组 DNA 提取得率和纯度

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒处理细菌获得的基因组 DNA 量与样本的来源、保存时间、培养时间等因素相关。一般正常情况下获得的细菌基因组 DNA 为细菌细胞中 DNA 总和，3 mL 过夜培养的细菌其基因组 DNA 产量约在 15-50  $\mu\text{g}$ 。实际操作中，获得的量可能会与该数据有些许出入。

## 基因组 DNA 片段大小

细菌基因组 DNA 提取试剂盒是采用硅胶膜柱分离纯化细菌基因组 DNA，纯化获得的基因组 DNA 片段大小均在 23 kb 附近。如图：



Bacterial DNA Isolation Kit提取3mL细菌基因组DNA，取5%DNA 0.8%琼脂糖凝胶电泳图

M： $\lambda$  DNA/HindIII Marker

1-3：DH5 $\alpha$ ，不带质粒

4-6：DH5 $\alpha$ ，携带质粒

## 注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小和产量下降。
- ◆ 该试剂盒一个纯化柱最多能处理 3 mL 过夜培养细菌；如果细菌量大于 3 mL，请分多个纯化柱进行处理，最后将洗脱的基因组 DNA 汇集在一起。
- ◆ 使用前，仔细检查 Buffer ML1、Buffer ML2 和 Buffer PW 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ◆ 洗脱体积：Buffer EB 不应少于 100  $\mu$ L，否则会影响 DNA 产量。
- ◆ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ◆ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ◆ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

## 实验材料和设备

- ◆ 各种来源的细菌样本(冻存的、新鲜的)。
- ◆ 1.5 mL 或 2 mL 无菌离心管。
- ◆ 无水乙醇。
- ◆ 台式离心机( $\geq 13,400 \times g$ )、37°C 摇床、65°C 水浴或金属浴、移液器、涡旋仪等。



## Lysozyme 溶液配制

使用前，Lysozyme 配制成浓度为 100 mg/mL 的溶液。Lysozyme 溶液避免反复冻融，分装成小份后于-20°C保存。使用前，将 Lysozyme 溶液在室温下溶解，每个样品用量为 40  $\mu$ L。

DE-05311

溶于 2.5 mL Buffer TE

## Buffer WB 添加乙醇

试剂盒使用前，请务必检查 WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前请按下表添加无水乙醇。

DE-05311

60 mL

## 安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医学、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer ML2、Buffer PW 含有胍盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer WB 含无水乙醇：易燃。
- ◆ Foregene Protease：增敏剂，刺激性。

## 操作指南

细菌基因组 DNA 提取试剂盒提供了一种快速处理细菌，纯化基因组 DNA 的方法，请严格按照细菌基因组 DNA 提取操作步骤进行相关实验。

### 材料取用说明

过夜培养的细菌：不超过 3 mL( $1 \times 10^9$ )。

### 操作步骤 (请严格按照本操作说明进行相关实验操作)

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取细菌过夜培养液  $\leq 3$  mL，室温下 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心 1 min，尽量吸尽上清。由于细菌来源不同，请按下面 1a、1b 进行操作。
  - 1a. 革兰氏阴性菌：收集菌体，离心去上清后直接进行步骤 2。
  - 1b. 革兰氏阳性菌：收集菌体，离心去除上清后，先加入 **160  $\mu$ L Buffer EB**，重悬菌体；再加入 **40  $\mu$ L Lysozyme(100 mg/mL)**，涡旋混匀后，37°C放置 30 min；7,200 rpm ( $\sim 5,000 \times g$ )离心 3 min，弃上清后进行步骤 2。
2. 向沉淀中加入 **380  $\mu$ L Buffer ML1**，涡旋振荡至菌体彻底悬浮。
3. 加入 **20  $\mu$ L Foregene Protease**，涡旋混匀。
4. 将离心管于 65°C金属浴中放置 20-30 min，每间隔 10 min 涡旋混匀一次。
5. 向离心管中加入 **380  $\mu$ L Buffer ML2**，颠倒混匀，65°C金属浴中放置 10 min。
6. 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心 5-10 min。
7. 吸取 **750  $\mu$ L** 上清至新的 2 mL 离心管中。

注意：在吸取上清时应避免沉淀被吸入，如果所吸取的上清中存在较多固体杂质，

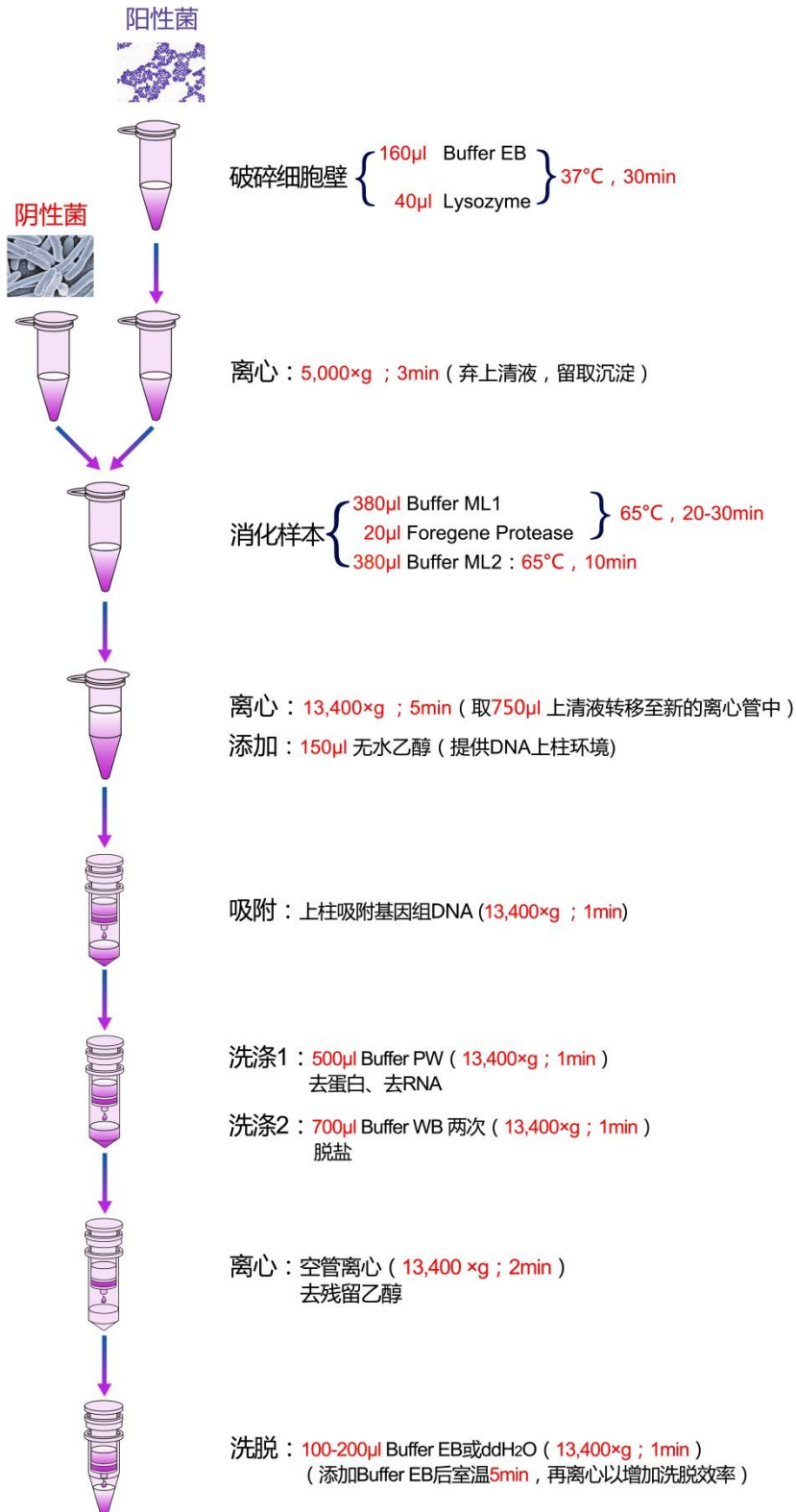
可重复步骤 6 一次。

8. 加入 **150  $\mu$ L 乙醇** (96-100%), 剧烈震荡至充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。
9. 将混合液和絮状沉淀转移至离心柱(DNA-Only Column)中, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g) 离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。
10. 将离心柱放回收集管中, 向离心柱中加入 **500  $\mu$ L Buffer PW**, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g)离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。
11. 将离心柱放回收集管中, 向离心柱中加入 **700  $\mu$ L Buffer WB**, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g)离心 1 min, 弃掉收集管中的废液。
12. 重复步骤 11 一次。
13. 将离心柱放回收集管中, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g)空管离心 2 min。
14. 将离心柱移至新的 1.5 mL 离心管中, 向膜中央悬空滴加 **100  $\mu$ L** 已于 **65 $^{\circ}$ C**预热的 **Buffer EB**(切勿将洗脱液添加到压圈上, 否则会损失较大体积的洗脱液), 室温放置 5 min, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g) 离心 1 min。再次向膜中央悬空滴加 **100  $\mu$ L** 已预热的 **Buffer EB**, 12,000 rpm( $\sim$ 13,400  $\times$ g) 离心 1 min。将两次收集的洗脱液合并。  
注意: 如果希望提高 DNA 的浓度, 可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中, 12,000 rpm ( $\sim$ 13,400  $\times$ g) 离心 1 min。

## DNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的基因组 DNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- ◆ DNA 的 OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50  $\mu$ g/mL 双链 DNA。
- ◆ DNA 的 OD<sub>260</sub>/280 $\approx$ 1.7-1.9。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液 Buffer EB, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。

## 快速操作示意图



## 问题分析指南

以下针对细菌基因组 DNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83361257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

### 低产量或无 DNA

通常有多种因素会影响细菌基因组 DNA 产量，包括菌种来源、样本保存条件、消化程度、操作等。

### 提取过程中无法获得基因组 DNA

1. 细菌样本保存不当或保存时间太长，导致基因组 DNA 已经降解。  
建议：细菌样本保存于-80°C；尽量使用新近培养的细菌进行基因组 DNA 的提取。
2. 细菌细胞壁没有破碎。  
建议：革兰氏阳性菌细胞壁很厚，需要使用 Lysozyme(100 mg/mL)在 37°C环境中进行细胞壁的降解。
3. Foregene Protease 保存不当，导致其活性失活而不能消化细菌细胞。  
建议：确认 Foregene Protease 保存条件或者更换新的 Foregene Protease 进行酶解反应。
4. 试剂盒保存不当或存放时间太长，导致试剂盒里面某些组分失效。  
建议：购置新的细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行相关操作。
5. Buffer WB 没有添加无水乙醇。  
建议：确认 Buffer WB 中添加正确体积的无水乙醇。
6. 洗脱液没有正确滴加到硅胶膜上。  
建议：将 65°C预热的洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

## 提取获得低产量基因组 DNA

### 1. 样本使用量过少。

建议：根据细菌的培养情况来确定细菌用量，有些细菌培养后浓度稀，可以适当增加菌液用量。

### 2. 革兰氏阳性菌破壁不完全。

建议：可适当增加 Lysozyme 用量或适当延长 Lysozyme 消化时间。

### 3. Foregene Protease 保存不当，导致其活性降低或失活。

建议：确认 Foregene Protease 保存条件或者更换新的 Foregene Protease 进行酶解反应。

### 4. 洗脱液问题

建议：请使用 Buffer EB 进行洗脱；如果使用 ddH<sub>2</sub>O 或其他洗脱液，确认洗脱液的 pH 值在 7.0-8.5 之间。

### 5. 洗脱液没有正确滴加

建议：请将洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

### 6. 洗脱液体积太少

建议：请按说明书上要求使用洗脱液进行基因组 DNA 洗脱，最少不要低于 100  $\mu$ L。

## 提取获得基因组 DNA 纯度低

基因组 DNA 纯度低会导致下游实验的失败或效果不理想，如：酶切不开，PCR 得不到目的基因片段等。

### 1. 杂蛋白污染、RNA 污染、内毒素污染。

分析：没有使用 Buffer PW 洗涤纯化柱；Buffer PW 洗涤纯化柱没有使用正确的离心转速。

建议：在上清液过柱时尽量保证上清液中无沉淀；务必按说明书进行 Buffer PW 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

### 2. 杂质离子污染。

分析：省略了 Buffer WB 洗涤纯化柱或者只洗涤了一次，导致残留的离子污染。

建议：务必按说明书使用 Buffer WB 洗涤 2 次，以尽量去除残留的离子。

### 3. RNA 酶污染。

分析：Buffer 中添加了外源的 RNA 酶；Buffer PW 洗涤操作不正确，导致 RNA 酶残留，影响下游 RNA 实验操作，如：体外转录等。

建议：Foregene 系列核酸提取试剂盒无需额外添加 RNA 酶即可去除 RNA，Bacterial DNA Isolation Kit 里面所有试剂均无需添加 RNA 酶；务必按说明书进行 Buffer PW 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

4. 乙醇残留。

分析：Buffer WB 洗涤纯化柱后，没有进行空管离心操作。

建议：按说明书进行正确的空管离心操作。

5. 其他杂质污染。

分析：细菌使用量过多，以至细菌破壁或消化不完全。

建议：明确细菌用量，一般情况下，> 3 mL 菌液分多个纯化柱进行处理。

中国·凡晶      World's Foregene

成都凡晶生物技术有限公司

电话：028-83360257, 028-83361257

E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

