For research use only Version Number : 1.1

Bacterial DNA Isolation Kit

For purification of total DNA from bacteria using ≤ 3 mL culture medium (maximum 1 × 10^9 cells)

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
Buffer TE	2.5 mL
Foregene Protease	1 mL
Lysozyme	250 mg
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

*：Buffer ML2、Buffer PW 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意带上手套和进行相关防护措施。

产品简介

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(1×10^9 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 μg 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。

离心柱中的 DNA-Only 硅胶膜可高效、特异吸附 DNA，无需添加任何有机试剂即可最大限度的去除 RNA、杂质蛋白、离子及细胞中的其他有机化合物。获得的 DNA 片段大，纯度高、质量稳定可靠。

储存条件

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

  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℃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℃保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4℃保存，切记不能置于-20℃保存。
- Lysozyme 为干粉状粉末，2-8℃保存长期(3 个月)具有活性，更长时间的保存，请置于-20℃。

DNA 提取得率与纯度

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 μg。实际操作中，获得的量可能会与该数据有些许出入。

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 片段较小且提取量也会下降。
- 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℃溶解，混匀后再使用。
- 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前添加 60 mL 无水乙醇(DE-05311)。
- 洗脱体积：Buffer EB 不应少于 100 μL，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℃)离心。
- 所有实验步骤均在常温(15-25℃)进行。

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℃保存。使用前，将 Lysozyme 溶液在室温下溶解，每个样品用量为 40 μL。
- 配制方法：250 mg Lysozyme 中加入 2.5 mL Buffer TE，完全溶解，混匀后分装保存。

©Copyright Foregene 2014/02. All rights reserved.

操作步骤

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 **≤ 3mL**，室温下 12,000 rpm (~13,400 ×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 µL Buffer EB**，重悬菌体；再加入 **40 µL Lysozyme (100 mg/mL)**，涡旋混匀后，37℃放置 30 min；7,200 rpm (~5,000 ×g) 离心 3 min，弃上清后进行步骤 2。
2. 向沉淀中加入 **380 µL Buffer ML1**，涡旋振荡至菌体彻底悬浮。
3. 加入 **20 µL Foregene Protease**，涡旋混匀。
4. 将离心管于 65℃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 µL Buffer ML2**，颠倒混匀，65℃金属浴中放置 10 min。
6. 12,000 rpm (~13,400 ×g)离心 5-10 min。
7. 吸取 **750 µL** 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 µL** 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(~13,400 ×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 µL Buffer PW**，12,000 rpm(~13,400 ×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 µL Buffer WB**，12,000 rpm(~13,400 ×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(~13,400 ×g)空管离心 2 min。
14. 将离心柱转移至新的 1.5 mL 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100 µL** 已于 **65℃**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(~13,400 ×g) 离心 1 min。再次向膜中央悬空滴加 **100 µL** 已预热的 **Buffer EB**，12,000 rpm(~13,400 ×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，12,000rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min。

©Copyright Foregene 2014/02. All rights reserved.