

Code No. 9763

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic
DNA Extraction Kit Ver.3.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 实验前的准备	1
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 不同起始量菌体提取 DNA 的线性关系	4
● 注意事项	4
● 不同材料的 DNA 提取量	4
● Q&A	5

● 制品说明

本试剂盒是专门用于提取各种革兰氏阳性/阴性细菌 (Gram-positive/negative Bacteria) 基因组 DNA 的小量纯化试剂盒。试剂盒采用了溶菌酶以及特别的细胞裂解系统, 由细胞裂解液裂解细胞释放基因组 DNA, 再结合 DNA 制备膜技术纯化基因组 DNA, 适用于革兰氏阴性菌及绝大部分革兰氏阳性菌。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点, 组织细胞裂解后, 提取操作仅需 20 分钟便可完成。使用本试剂盒可从 $1.0 \sim 5.0 \times 10^9$ (当 $OD_{600}=1$ 时, 认为 1 ml 菌液中含有 1.0×10^9 个细胞) 的细菌中纯化得到 $1 \sim 20 \mu\text{g}$ 的高纯度基因组 DNA, 提取得到的基因组 DNA 可用于 PCR 反应、Southern 杂交以及 RAPD、AFLP、RFLP 等多种分子生物学实验。

● 制品内容 (50 次量)

本试剂盒分 Part I 和 Part II 两部分

■ Part I 部分 (-20°C保存)

Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
Lysozyme (20 mg/ml)* ¹	1.25 ml × 2
RNase A (10 mg/ml)	500 μl

*1 应尽量避免反复冻融, 融化后请于 4°C 长期保存。

■ Part II 部分 (请于室温 15~25°C保存)

Buffer BS	28 ml
Buffer GL* ¹	12 ml
Buffer GB* ¹	12 ml
Buffer WA* ¹	28 ml
Buffer WB* ²	24 ml
Elution Buffer	14 ml
Spin Columns	50 支
Collection tubes	50 支

*1 含有强变性剂, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*2 在首次使用前, 请添加 56 ml 的 100%乙醇, 混合均匀。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 灭菌水

● 保存与运输

1. 本试剂盒分三部分保存, Part I 请于 -20°C 保存, 其中 Lysozyme (20 mg/ml) 融化后请于 4°C 长期保存; Part II 于室温下 (15-25°C) 保存。
2. 本试剂盒分两部分运输, Part I 请于 -20°C 条件下运输; Part II 于室温下 (15-25°C) 运输。

● 实验前的准备

1. 准备 37°C (提取 Gram-positive Bacteria 时需要)、56°C 水浴。
2. Buffer GL 若出现沉淀, 请于 65°C 加热溶解, 待恢复至室温后使用。
3. Buffer WB 在首次使用前, 请添加 56 ml 的 100%乙醇, 混合均匀。
4. 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时, 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65°C 使用将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

● 操作方法

操作流程见图 1，分为菌体裂解、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，菌体裂解后操作约需 20 分钟，详细说明如下：

◆ Gram-negative Bacteria 的裂解：

- ① 用 1.5 ml Tube 收集 $1.0\sim 5.0E+09$ 的细胞，12,000 rpm 离心 2 分钟，弃上清（细胞培养液）。
- ② 加入 180 μ l 的 Buffer GL、20 μ l 的 Proteinase K (20 mg/ml) 和 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml) 充分振荡混匀，于 56°C 水浴温育 10 分钟，此时溶液应呈透明、澄清状。
- ③ 加入 200 μ l 的 Buffer GB 和 200 μ l 的 100% 乙醇，充分吸打混匀。

◆ Gram-positive Bacteria 的裂解：

- ① 用 1.5 ml Tube 收集 $0.5\sim 2.0E+09$ 的细胞（对于细胞壁结构特殊和生长状态较老的 Gram-positive Bacteria，建议起始量不要超过 $1.0E+09$ 的细胞），12,000 rpm 离心 2 分钟，弃上清（细胞培养液）。
- ② 加入 500 μ l 的 Buffer BS 重悬细胞、加入 50 μ l 的 Lysozyme (20 mg/ml)，充分吸打混匀，于 37°C 水浴温育 60 分钟（温育期间可每隔 20 分钟颠倒混匀一次）。
- ③ 12,000 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
- ④ 加入 180 μ l 的 Buffer GL、20 μ l 的 Proteinase K (20 mg/ml) 和 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml)，充分吸打混匀，于 56°C 水浴温育 10 分钟，此时溶液应呈透明、澄清状（如果此时溶液未透明澄清，可延长裂解时间至 30 分钟，并每隔 5 分钟吸打混匀一次）。加入 200 μ l 的 Buffer GB 和 200 μ l 的 100% 乙醇，充分混匀。

处理好的细胞按如下操作进行：

1. 将 Spin Column 安装在 Collection Tube 上，溶液移至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 2 分钟，弃滤液。
2. 将 500 μ l 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
3. 将 700 μ l 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。

注) 请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。

请沿 Spin Column 管壁四周加入 Buffer WB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

4. 重复操作步骤 3。

5. 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，12,000 rpm 离心 2 分钟。

6. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 离心管上，在 Spin Column 膜的中央处加入 50~200 μ l 的灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 5 分钟。

注) 将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65°C 使用时有利于提高洗脱效率。

7. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。如需获得更大收量，可将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央 或再加入 50~200 μ l 的灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 5 分钟后，12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。

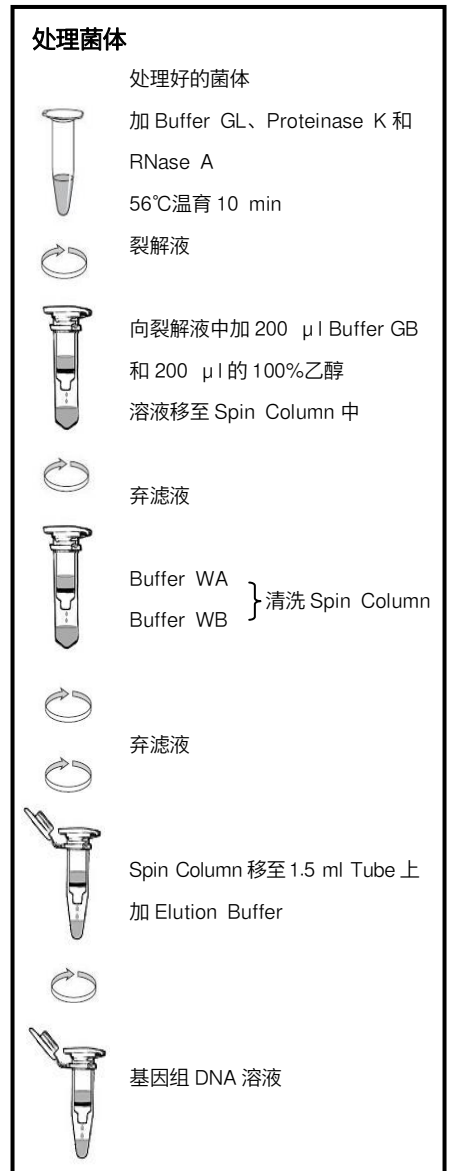


图 1. 操作流程简图

8. 基因组 DNA 定量。提取得到的基因组 DNA 可通过电泳或测定吸光度定量。

● 实验例

1. 从 Gram-positive Bacteria 中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 Gram-positive Bacteria 中提取基因组 DNA，最终分别从 2.0×10^9 的 *Bacillus subtilis*、*Lactobacillus plantarum*、*Acidiphilium facilis*、*Kocuria kristinae* 纯化得到了约10 μg 、6 μg 、6 μg 、8 μg 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图2。

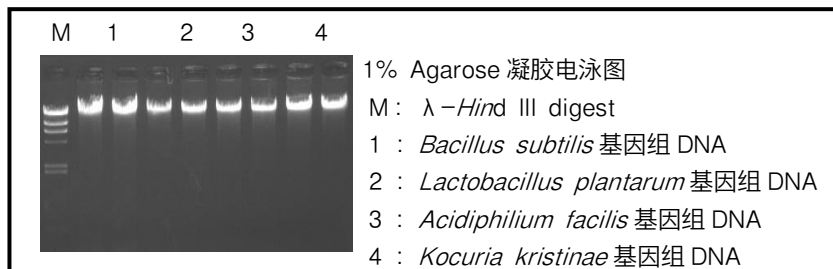


图 2. 从 Gram-positive Bacteria 中提取的基因组 DNA

2. 从 Gram-negative Bacteria 中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 Gram-negative Bacteria 中提取基因组 DNA，最终分别从 2.0×10^9 的 *Acetobacter aceti*、*Enterobacter aerogenes*、*Serratia marcescens* Sb、*Escherichia.coli* JM109 纯化得到了约6 μg 、8 μg 、8 μg 、10 μg 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 3。

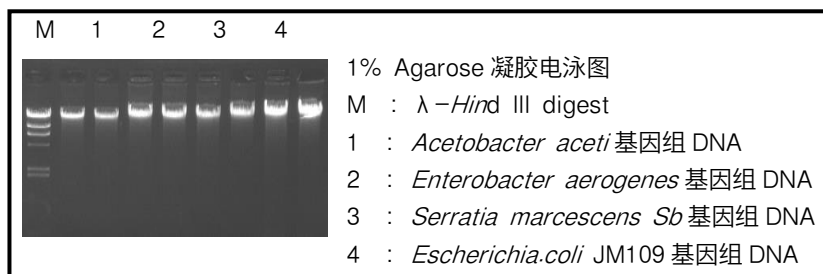


图 3. 从 Gram-negative Bacteria 中提取的基因组 DNA

3. 从 *Staphylococcus aureus* 中提取的基因组 DNA 作为模板，扩增 3.4 kb 片段的实验例

使用本试剂盒从 2.0×10^9 *Staphylococcus aureus* 中提取得到约6 μg 基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板，PCR 扩增了 R.Sau3A I 基因约 3.4 kb 的 DNA 片段。其电泳结果见图 4。

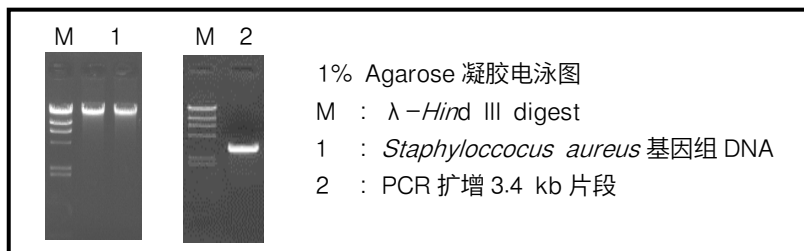


图 4. 从 *Staphylococcus aureus* 中提取的基因组 DNA 和 PCR 扩增结果

● 不同起始量菌体提取 DNA 的线性关系

使用本试剂盒提取 1.0E+09、2.0E+09 和 5.0E+09 *Microbacterium oxydans* 的基因组 DNA，洗脱时使用 200 μ l Elution Buffer 洗脱，DNA 收量如图 5 所示。



图 5. 不同起始量 *Microbacterium oxydans* 提取的基因组 DNA

● 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的菌体，以确保提取的基因组 DNA 的收量及完整性。
2. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。
3. 基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 溶出。
4. 菌体起始量不要过多，过夜培养的菌体 0.1~1 ml 集菌即可。

● 不同材料的 DNA 提取量（已验证）

2.0E+09 起始的 Gram-positive Bacteria 使用本试剂盒所能提取的 DNA 量如下：

材料	DNA 收量
<i>Microbacterium oxydans</i>	6~10 μ g
<i>Bacillus subtilis</i>	8~10 μ g
<i>Kocuria varians</i>	6~10 μ g
<i>Staphylococcus aureus</i>	3~8 μ g
<i>Enterococcus durans.</i>	6~10 μ g
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	6~10 μ g
<i>Enterococcus gallinarum</i>	5~8 μ g
<i>Anabaena flos-aquae</i>	6~10 μ g
<i>Arthrobacter luteus</i>	6~12 μ g
<i>Nocardia</i>	5~8 μ g
<i>Brevibacterium linens</i>	5~8 μ g
<i>Caryophanon latum L</i>	5~8 μ g
<i>Caseobacter polymorphus</i>	5~8 μ g
<i>Streptomyces</i>	5~8 μ g
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5~8 μ g

2.0E+09 起始的 Gram-negative Bacteria 使用本试剂盒所能提取的 DNA 量如下:

材料	DNA 收量
<i>Escherichia.coli</i> JM109	6~10 μ g
<i>Acetobacter aceti</i>	6~10 μ g
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10~15 μ g
<i>Acidiphilium organovororum</i> 13H	10~15 μ g
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6~10 μ g
<i>Flavobacterium balustinum</i>	10~15 μ g
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	6~10 μ g
<i>Serratia marcescens</i> Sb	8~15 μ g

● Q&A

Q1. 基因组 DNA 的收量如何?

A1. 本试剂盒适合于细菌的基因组 DNA 提取。基因组 DNA 的提取量根据细菌不同而各异, 一般情况下, 从 2.0E+09 的细菌中, 可以提取约 5~15 μ g 的基因组 DNA; 从 2.0E+09 的 *E.coli* JM109 细胞中, 可以提取约 10 μ g 的基因组 DNA; 从 2.0E+09 的 *Staphylococcus aureus* 细胞中, 可以提取约 6 μ g 的基因组 DNA。

Q2. 基因组 DNA 的收量较低或无基因组 DNA, 为什么?

A2. 基因组 DNA 收量较低时, 可以从以下几个方面考虑:

- ① 实验材料量太少, 比如从 2.0E+06 细菌中提取的基因组 DNA 是电泳检测不到的;
- ② 裂解不充分, DNA 未充分释放。由于各种细菌细胞壁的结构差异较大, 所以裂解条件也有所差异, 菌体完全裂解后应呈透明、澄清状, 且当 DNA 含量较高时, 溶液较粘稠。裂解不充分时, 溶液呈浑浊状, 可以适当延长 Lysozyme (20 mg/ml)作用时间或增加使用量, 或增加 Buffer GL 的使用量;
- ③ 提取的细菌中基因组 DNA 含量较少, 适当增加菌体使用量;
- ④ 菌体量过大, 裂解困难, 按比例适当增加 Lysozyme、Buffer GL 的加量或分成多份进行提取;
- ⑤ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65°C 后使用将有利于提高洗脱效率;
- ⑥ 请严格按照操作方法进行操作。

Q3. 提取的基因组 DNA 有降解, 为什么?

A3. ① 细菌不够新鲜, 收集后的细菌未及时处理或未低温保存。我们建议材料应尽量在 -80°C 保存, 运输过程中亦应使用干冰等。
② 材料本身有残留的 DNA 酶活性。可以增加一次 Buffer WA 的清洗操作。
③ 如需长期保存提取的 DNA, 请用 Elution Buffer 溶出。

Q4. 提取的基因组 DNA 中有 RNA 污染, 为什么?

A4. ① 实验过程中没有使用 RNase A。应严格按照实验操作要求使用 RNase A。
② RNase A 可能失活。RNase A 尽可能在 -20°C 下保存, RNase A 活性比较稳定, 一般不易失活。

Q5. 提取的基因组 DNA 反应性能差, 为什么?

A5. ① 提取的基因组 DNA 中盐份浓度过高。在使用 Buffer WA 和 Buffer WB 进行 DNA 制备膜的清洗时, 请沿 Spin Column 的管壁四周加入, 且加入 Buffer WB 后室温静置 5 分钟, 有助于彻底清洗掉 Column 上残留的盐离子, 这样有利于提高清洗效果。
② 洗脱液中残留乙醇, 在向 Column 中加入洗脱液之前, 将 Column 在室温下静置 2 分钟有助于使 Column 上残留的乙醇彻底挥发, 然后再加入洗脱液洗脱。

③ 进行 DNA 洗脱时请一定在膜的中央加入洗脱液，尽量不要沾染 Spin Column 的管壁四周。

Q6. 菌体量若超出说明书规定用量时怎么办？

A6. 本试剂盒主要用于小量基因组 DNA 的制备，当菌体量超出说明书的要求用量时，可以按比例适当增加 Lysozyme、Buffer GL 及 Buffer GB 的用量，裂解后分到多个 Spin column 中进行实验操作。菌体量最好控制在规定范围内，否则会影响裂解和收量，如果裂解不充分会堵塞 Spin column，造成实验失败。

Q7. 菌体起始量多少为宜？

A7. 一般情况下 LB 过夜培养的 *Escherichia.coli* JM109 OD₆₀₀≈3~4 OD/ml，0.5 ml 集菌即可，即菌体起始量 2 OD (约 1.0~2.0E+09 cells) 为宜。菌体起始量不可过多，否则裂解不够充分会堵塞 Spin column，从而导致 DNA 收量降低。

Q8. 该试剂盒是否可以进行所有细菌的 DNA 提取？

A8. 本试剂盒可以进行绝大多数革兰氏阴性和阳性细菌的基因组 DNA 提取，但是有个别革兰氏阳性菌(如：*Bacillus thuringiensis* (苏云金杆菌)的细胞壁结构比较特殊，裂解较困难，DNA 提取量稍少。如果遇到裂解较困难的细菌可先进行液氮研磨等物理破碎方法，然后按照革兰氏阴性细菌的操作方法进行基因组 DNA 提取。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 TAKARA BIO INC. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da