

## Bacterial DNA Extraction Mini Kit B

### 细菌 DNA 小提试剂盒 B

本产品适合于从小于 $<1.5 \times 10^9$ 个细菌中提取高纯度的 DNA，也适合从组织、血液、分泌物或拭子等样品提取得到寄生的微生物 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。该方案得到的 DNA 包括有基因组 DNA 和质粒 DNA。

### 产品组份

产品编号	DNB361-01B	DNB361-02B	DNB361-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
DNA Extraction Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer STE	5 ml	20 ml	70 ml
Buffer MBL	5 ml	20 ml	70 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2A	3 ml	20 ml	2 x 40 ml
Buffer EB	1 ml	10 ml	60 ml
Lysozyme	20 mg	100 mg	500 mg
Proteinase K	300 $\mu$ l	1.1 ml	5.5 ml
Lysozyme Buffer	0.6 ml	3 ml	15 ml
RNase Solution	60 $\mu$ l	300 $\mu$ l	1.5 ml

### 保存条件

本产品除 Lysozyme 和 RNase Solution 外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}$ C。低温下， Buffer MBL 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。Lysozyme 干粉和 RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于-20~8 $^{\circ}$ C。溶解后，Lysozyme 需保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 准备事项

- 55℃和 70℃水浴锅
- 溶解 Lysozyme (50mg/ml) :溶解 Lysozyme 至终浓度 50mg/ml, 轻轻颠倒让溶菌酶充分溶解。Proteinase K 可在室温保存一年, 长期保存请放于-20℃。反复冻融 Proteinase K 会影响其活性。
- Buffer W1A 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

### 方案 1: 菌液中提取 DNA

转移 0.5-1ml 培养液( $<5 \times 10^8$  个细菌)至 1.5ml 离心管中。10,000 x g 离心 1 分钟收集细菌, 倒弃培养液, 按纯化步骤开始进行处理。

若培养液密度比较大, 离心速度和离心时间都可能需要提高, 以保证细菌的充分沉淀收集。若需要从菌斑中提取 DNA: 用接种环刮下菌斑, 按纯化步骤进行操作, 并把菌斑转移至 220ul Buffer STE 中, 涡旋混匀。

### 方案 2: 组织/血液/体液分泌物/痰液中提取细菌 DNA

#### 组织类样品:

取 50~100mg 样品, 加入 800 $\mu$ l Buffer PBS (自备), 用匀浆器进行充分匀浆, 静置 10 分钟后, 取 0.5ml 上清, 10,000 x g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按阳性菌纯化步骤进行操作。

#### 全血/细胞悬液:

取 0.5~1ml 抗凝血液, 加入 3 倍体积灭菌水, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 x g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按阳性菌纯化步骤进行操作。

#### 分泌物或体液类等:

10,000 x g 离心 3 分钟收集细胞和细菌; 倒弃上清液, 按阳性菌纯化步骤进行操作。

#### 粘稠的分泌物:

取 0.1~1g 痰液等, 用胰蛋白酶将痰液进行充分液化, 10,000 x g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按阳性菌纯化步骤进行操作。

## 纯化步骤

1. 加入 220 $\mu$ l Buffer STE、30 $\mu$ l Lysozyme 和 5 $\mu$ l RNase Solution 至细菌沉淀团中。涡旋充分重悬细菌（阴性菌），37 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟。  
处理阳性细菌时按照以下步骤进行处理：加入 220 $\mu$ l Buffer STE、30 $\mu$ l Lysozyme 和 5 $\mu$ l RNase Solution 至细菌沉淀团中，37 $^{\circ}$ C 处理 30min，处理葡萄球菌属的细菌时，可加入 1 $\mu$ l Lysostaphin（20mg/ml）
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l Buffer MBL 至裂解液中，充分颠倒涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 振荡温浴 10 分钟。
3. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液或上清液中。涡旋混匀 15 秒。  
这一步若有明显的絮状沉淀，用移液枪吸打几次尽量打散沉淀。
4. 把 DNA Extraction Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移第 3 步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
若柱子出现堵塞，提高离心速度至 13,000  $\times$  g，离心 3 分钟。
5. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W1A(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 10 秒。  
Buffer W1A 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 10 秒。  
Buffer W2A 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。
8. 重复 6~7 步一次。
9. 13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~150 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer EB 至柱子膜中央。放置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
处理 DNA 含量很低的样品无需第二次洗脱。若需获得的最高产量，建议进行第二次洗脱。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品用量。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于  $12,000 \times g$  离心 3 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- **样品用量太多：**减少样品用量。
- **样品消化不充分：**加入 Buffer MBL 后应充分涡旋混匀。
- **Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。**
- **加入乙醇后有沉淀析出时，**用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。
- **Lysozyme 活力下降：**更换新的溶菌酶，建议溶菌酶溶解后进行分装保存，每管保存 10 次用量以减少反复冻融次数。