

FastPure Bacterial DNA Kit Handbook

FastPure 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure Bacterial DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1208-50T	EK-1208-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer BB	25mL	50mL
Buffer IRB	17mL	34mL
Buffer WB	12mL	24mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	1.1mL	2.2mL
Lysozyme Solution (50mg/mL)	2mL	4mL
Buffer EB	15mL	30mL
DNA Mini Columns	50	100
2mL Collection Tubes	50	100
使用手册	1	1

产品介绍

本产品适合于从 1×10^9 培养细菌样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60min。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern Blot 等实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K Solution 和 Lysozyme Solution 外，可在室温(15~25°C)保存 12 个月。Proteinase K Solution 和 Lysozyme Solution 请分装保存于 -20°C。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无菌 1.5mL 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
- 若 Buffer BB 或 Buffer IRB 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- 水浴锅温度设置至 70°C。

开始前试剂准备

- Buffer IRB 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇
- Buffer WB 按瓶子标签所示提前加入相应体积的无水乙醇

操作步骤:

1. 取 200 μ L 细菌菌液（最多不超过 1×10^9 cells）于无酶 1.5 mL 离心管中。
2. 10000 \times g 离心 1min 或 3000 \times g 离心 5min 收集细菌沉淀。
3. 加入 200 μ L 无菌 PBS 将细菌重悬。
对于在丰富培养基中生长的细菌，建议重复步骤 2-3 洗涤两次，以去除残留杂质。
4. 加入 30 μ L Lysozyme Solution 至溶液中，充分涡旋混匀 15-20s 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 15-30min。
对于革兰氏阳性菌，若发现裂解不彻底，可将孵育时间延长至 60 min 或适当增加溶菌酶用量。
5. （可选）加入 5 μ L RNase A Solution (20mg/mL，自备) 至消化液中，颠倒混匀，室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 5-10min。
6. 将所得溶液加入 200 μ L Buffer BB 并充分混匀，加入 20 μ L Proteinase K Solution 后立即混匀，彻底混匀后置于 70 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 10min。
水浴结束后，简短离心以收集管盖冷凝水。
7. 将溶液从水浴中取出，并加入 100 μ L 异丙醇充分混匀。
加入异丙醇后应立即充分混匀，若产生丝状沉淀属于正常现象。
8. 于 13000 \times g 离心 5min，吸取上清转移至核酸吸附柱中（提前套在 2mL 收集管中）。
9. 以 8000 \times g 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer IRB，8000 \times g 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
11. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer WB（已加入无水乙醇），8000 \times g 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
12. 重复操作步骤 11 一次。
13. 倒弃废液，最大转速（ $\sim 13,400 \times$ g）离心 2 min。将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管，开盖室温静置 5-10 min 以彻底挥发残留乙醇。
注意：Buffer WB 中的乙醇残留会影响后续的酶反应实验。
14. 向吸附柱膜中间位置悬空滴加 50-100 μ L Buffer EB，室温静置 2min 后，最大转速

（ $\sim 13,400 \times$ g）离心 2min 收集核酸溶液。丢弃柱子，盖上 EP 管盖子置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意：洗脱体积不应小于 30 μ L，体积过少会影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。为了提高 DNA 的回收量，可将 Buffer EB 加热（约 60 $^{\circ}$ C）并洗脱两次，可增加约 15-20% 得率。

常见问题:

1. 柱子堵塞
 - 样品用量太多: 减少样品用量。细菌细胞量应控制在 1×10^9 以内。
 - 样品裂解不充分: 重新提取，加入 Buffer BB 及蛋白酶 K 后充分涡旋混匀。
2. DNA 纯度不达标:
 - 样品用量太多: 减小用量。
3. DNA 产量低
 - 试剂准备有误: 检查 Buffer IRB 和 Buffer WB 中是否加入无水乙醇。
 - 样品消化不充分: 用液氮或研磨仪可提高样品消化效果，延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
 - 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。