

细胞/细菌/酵母基因组 DNA 小量提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒采用独特的细胞裂解液, 配合 **proteinase K** 裂解细胞释放基因组 DNA, 释放的基因组 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上。

适合从 $\leq 5 \times 10^6$ 动物细胞、 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌或 $\leq 5 \times 10^7$ 酵母细胞中提取多至 20 μg 基因组 DNA。纯化的基因组 DNA 长度可达 20-30 kb, 适合用于酶切、PCR、Southern 杂交、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

本试剂盒使用 DNA 吸附柱-C30 回收 DNA, 最大吸附量为 30 μg , 最小洗脱体积为 40 μl 。

从革兰氏阳性细菌中提取基因组 DNA, 需用户自备或者购买 **Lysozyme** 裂解缓冲液 (Cat#RE103);

从金黄色葡萄球菌中提取基因组 DNA, 需用户自备或者购买 **Lysostaphin** (Cat#RE104);

从酵母中提取基因组 DNA, 需用户自备或者购买 **Lyticase** 裂解缓冲液 (Cat#RE102);

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK621-01 (50 次)	DK621-02 (200 次)	原理与用途
Proteinase K*	250 μl	1 ml	降解蛋白
Buffer CS	15 ml	35 ml	悬浮细胞
Buffer CL	17 ml	70 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer WAG	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 [§]	16 ml	65 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-C30	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	50 个 \times 3	200 个 \times 3	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个	接收洗脱的 DNA
TE ^{**}	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存; 如析出不溶物, 使用前摇晃混合均匀。

[§]Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

**TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0(25°C)。

所有试剂盒组成成分可于室温储存。

三、注意事项

1. Buffer CL 和 Buffer WAG 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果。

四、实验准备

1. 70°C 水浴; 预热 TE 或去离子水 (pH \geq 7)。
2. 无水乙醇。
3. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇, 混合均匀。

五、从动物细胞中提取基因组 DNA

如未注明，所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

1. 样品收集

- 悬浮培养的动物细胞：3,000×g 离心 5 min，收集 $\leq 5 \times 10^6$ 细胞，弃尽上清。
- 贴壁培养的细胞：用温和方法(例如胰蛋白酶消化)处理成细胞悬液，3,000×g 离心 5 min，收集 $\leq 5 \times 10^6$ 细胞。弃尽上清。
- 已分离的淋巴细胞和分散的动物组织细胞等：估计细胞数量($\leq 5 \times 10^6$ 细胞)，彻底去除残留的分离液。
! 需彻底去除离心上清，不然会影响裂解效果。

2. 加入 150 μ l Buffer CS，用 1 ml 枪头吹打或 Vortex 震荡充分悬浮细胞。

可选步骤：如需去除 RNA，在此步骤加入 8 μ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

3. 加入 5 μ l Proteinase K 和 300 μ l Buffer CL，用力摇晃 20 次混合均匀，置于 70℃ 水浴 10 min。

4. 加入 230 μ l 无水乙醇，用力摇晃 10 次混合均匀 (! 请勿离心)。

5. 将溶液转入 DNA 吸附柱-C30(置于收集管)，1 min，将 DNA 吸附柱-C30 转入另一个干净的收集管中。

6. 加入 500 μ l Buffer WAG，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C30 转入另一个干净的收集管中。

7. 加入 500 μ l Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C30 放回收集管中。

8. 重复步骤 7。

9. 离心 2 min。

10. 将 DNA 吸附柱-C50 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加 ≥ 40 μ l TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，室温放置 1-2min，离心 1 min。

在硅胶膜的中央再加入 ≥ 40 μ l TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，重复洗脱；洗脱总体积不可超过 250 μ l。

56-70℃ 预热 TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，可以提高洗脱效率。

如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。

六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA

如未注明，所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

1. 样品收集

- 液体培养的细菌：培养至 OD600 为 1-1.5，约 1.0×10^9 细胞/ml 菌液；5,000×g 离心 10 min，收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌。
- 固体培养的细菌：刮取固体培养基表面的菌落，收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

2. 加入 150 μ l Buffer CS，用 1 ml 枪头吹打或 Vortex 震荡充分悬浮细胞。

3. 加入 5 μ l Proteinase K 和 300 μ l Buffer CL，用力摇晃 20 次混合均匀，置于 70℃ 水浴 10 min。

可选步骤：如需去除 RNA，在此步骤加入 8 μ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)。RNA 残留不影响 PCR，但影响定量、酶切。

4. 离心 1 min，将离心上清转入另一个干净的 1.5 ml 离心管；加入 230 μ l 无水乙醇，用力摇晃 10 次混合均匀 (! 请勿离心)。

! 离心去除未消化细菌，勿将沉淀转移到干净的离心管，否则会堵塞 DNA 吸附柱-C30 中的吸附膜，影响 DNA 产量和纯度。

5. 将溶液转入 DNA 吸附柱-C30(置于收集管)，1 min，将 DNA 吸附柱-C30 转入另一个干净的收集管中。

6. 加入 500 μ l Buffer WAG，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C30 转入另一个干净的收集管中。

7. 加入 **500 µl Buffer WB1**, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-C30 放回收集管中。
8. 重复步骤 7。
9. 离心 2 min。
10. 将 DNA 吸附柱-C50 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 向硅胶膜的中央加 ≥ 40 µl TE 或去离子水(pH ≥ 7.0), 室温放置 1-2min, 离心 1 min。

在硅胶膜的中央再加入 ≥ 40 µl TE 或去离子水(pH ≥ 7.0), 重复洗脱; 洗脱总体积不可超过 250 µl。

56-70°C 预热 TE 或去离子水(pH ≥ 7.0), 可以提高洗脱效率。

如果使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。

七、革兰阳性菌和真菌破壁方法

革兰氏阳性菌和真菌需使用特异性酶或机械力破壁, DNA 产量与破壁效率有关。

A. 大多数革兰氏阳性细菌破壁方法

已知下列革兰氏阳性菌的细胞壁能被 Lysozyme 破坏:

Clostridia butyricum (丁酸梭状芽胞杆菌)

Clostridia Spotogenes (孢子梭状芽胞杆菌)

Clostridia tyrobutyricum (干酪丁酸梭状芽胞杆菌)

Listeria monocytogenes Scott A (单核细胞增多李氏菌)

用户需自备或购买 **Lysozyme 裂解缓冲液 (Cat#RE103)**:

组成内容	RE103 (50 次)	成分与储存条件
Lysozyme	1.5 ml	150 mg/ml, -20°C 长期保存。
1.25xLysozyme Buffer	10 ml	25mM Tris, pH8.0(25°C), 2.5mM EDTA, 1.5% Triton; 室温储存。

A1. 样品收集

- a. 液体培养的细菌: 培养至 OD600 为 1-1.5, 约含 1.0×10^9 细胞/ml 菌液。室温 $5,000 \times g$ 离心 10 min, 收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌。
- b. 固体培养的细菌: 刮取固体培养基表面的菌落, 收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

A2. 加入 120 µl 1.25xLysozyme Buffer 和 30 µl Lysozyme (150 mg/ml), 充分悬浮沉淀, 37°C 水浴 30 min。

继续六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA---操作步骤 3

B. 金黄色葡萄球菌破壁方法

Lysostaphin 能有效裂解金黄色葡萄球菌细胞的细胞壁, 用户需自备或购买 **Lysostaphin(1.2U/µl) (Cat#RE104, 500 µl)**。

B1. 样品收集

- a. 液体培养的细菌: 培养至 OD600 为 1-1.5, 约 1.0×10^9 细胞/ml 菌液。室温 $5,000 \times g$ 离心 10 min, 收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌。
- b. 固体培养的细菌: 刮取固体培养基表面的菌落, 收集 $\leq 2 \times 10^9$ 细菌到干净的 1.5 ml 离心管。

D2. 加入 140 µl Buffer CS, 充分悬浮沉淀。

D3. 处理金黄色葡萄球菌, 加入 10 µl Lysostaphin(1.2U/µl); 混合均匀, 37°C 水浴 30 min。

处理表皮葡萄球菌加入 20 µl Lysostaphin(1.2U/µl); 混合均匀, 37°C 水浴 30 min。

继续六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA---操作步骤 3

C. 酵母细胞破壁方法

液体培养的酵母细胞分散性较好, Lyticase 能有效裂解酵母细胞的细胞壁, 用户需自备或购买 **Lyticase 裂解缓冲液 (Cat# RE102)**:

组成内容	RE102 (50 次)	成分与储存条件
Lyticase	250 μ l	12 U/ μ l, -20 $^{\circ}$ C长期保存。
山梨醇 Buffer	25 ml	1M 山梨醇, 10 mM EDTA pH7.5(25 $^{\circ}$ C), 14mM β -巯基乙醇; 室温储存。

C1. 培养酵母菌至 OD600 为 1-1.5, 约 $1-2 \times 10^7$ 细胞/ml 菌液。用干净的 1.5 ml 离心管, 12,000 \times g 离心 1 min, 收集 $\leq 5 \times 10^7$ 酵母细胞, 弃上清。

C2. 加入 495 μ l 山梨醇 Buffer 和 5 μ l Lyticase (12 U/ μ l), 充分悬浮沉淀。固定在摇床上, 30 $^{\circ}$ C, 220 rpm 震荡 1 小时;

5000 \times g 离心 5 min, 弃尽上清。

继续六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA---操作步骤 2

D. 霉菌破壁方法

细胞壁裂解酶能有效裂解霉菌细胞的细胞壁, 用户需自备细胞壁裂解酶和裂解缓冲液:

a. 配制裂解缓冲液 Buffer KC: 0.64 M KCl, 0.2 M CaCl₂;

b. 准备细胞壁裂解酶: Driselase (Sigma Pro.No. D9515) , Lysing enzyme (Sigma Pro.No. L1412) ;

c. 用 Buffer KC 配制 5 \times 细胞壁裂解酶: 称取 Driselase 和 Lysing enzyme 各 300mg, 加入 6ml Buffer KC 充分溶解 (可能有不溶的成分, 不影响使用), 再加入 4ml 甘油混合均匀, -20 或 -70 $^{\circ}$ C 保存。

D1. 取 1 mm \times 1 mm 的菌丝块或 4×10^6 霉菌细胞, 转入 1.5 ml 离心管中。

D2. 加 1ml Buffer KC 剧烈摇晃, 12,000 \times g 离心 20 秒, 弃上清; 重复此步骤 2 次。

D3. 加 800 μ l Buffer KC 和 200 μ l 5 \times 细胞壁裂解酶, 将 1.5ml 离心管固定在摇床上, 30 $^{\circ}$ C, 60 rpm 震荡 3 小时; 700 \times g 离心 4 min, 弃尽上清。

继续六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA---操作步骤 2

E. 液氮研磨破壁

E1. 称取 50-100 mg 真菌菌块或菌丝, 或收集 $\leq 5 \times 10^7$ 真菌细胞, 转入研钵中。

E2. 加入少量液氮, 迅速研磨, 待样品变软, 再加少量液氮, 再研磨, 如此三次; 加入 150 μ l Buffer CS, 迅速研磨至样品融化。

E3. 将融化的样品转入干净的 1.5 ml 离心管中, 在研钵中加入 50 μ l Buffer CS 清洗研钵和研磨棒, 合并入 1.5ml 离心管中。

▲RNA 残留可能会影响酶切但不影响 PCR。如需去除 RNA, 可在此步骤加入 8 μ l RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02), 混合均匀。

继续六、从革兰氏阴性中提取基因组 DNA---操作步骤 3

八、常见问题解答

Q1 使用本试剂盒获得的 DNA 的长度为 20-30 kb, 试剂是否会造成 DNA 降解?

A1 本试剂盒采用硅胶材料吸附 DNA 的原理回收 DNA。基因组 DNA 为线性长链状 DNA, 能与硅胶材料多点结合, 后续的离心过程中因机械力而发生断裂成为 20-30 kb 的片段; 但可以满足 PCR 等常规的实验。试剂不会造成 DNA 降解, DNA 完整性与样品的保存方法, 保存时间有关。

Q2 后续 PCR 产物

A2. 革兰氏阳性菌或真菌破壁不充分, 见A3.2。

Q3 产量极少或根本没有获得 DNA

A3.1 有大量RNA, 电泳时核酸染料(包括EB,GelRed等)优先结合RNA, 无法观察基因组DNA, 需延长电泳时间。

A3.2 革兰氏阳性菌或真菌未充分破壁。分散的单细胞菌建议使用特异性酶破壁, 菌丝或菌块建议使用液氮研磨破壁。