

UE 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒

本试剂盒采用独特的细胞裂解和相分离技术，结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到纯化基因组 DNA 的目的。适合于从 1.0×10^9 细菌中获得多至 20 μg 的基因组 DNA。用于 PCR、Southern 印迹分析、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-BT-GDNA-50	UE-MN-BT-GDNA-250
Kit size	50 preps	250 preps
Miniprep column	50	250
Spin-filter	50	250
2 ml Microfuge tube	150	750
1.5 ml Microfuge tube	50	250
RNase A	20 μl	100 μl
Lysozyme	60 mg	2 \times 140 mg
Buffer S	10 ml	50 ml
0.25M EDTA	2 ml	10 ml
Buffer G-A	26 ml	130 ml
Buffer G-B	26 ml	125 ml
Buffer DV (empty)	1	1
Buffer DV-A	5 ml	10 ml
Buffer BV	25 ml	125 ml
Buffer W1	28 ml	145 ml
Buffer W2 concentrate	24 ml	2 \times 72 ml
Eluent	12 ml	60 ml
Protocol manual	1	1

RNase A: 50 mg/ml, 室温贮存 6 个月; 长期贮存于 -20°C 。

溶菌酶: 50%甘油溶解溶菌酶, 使溶菌酶浓度为 50 mg/ml, -20°C 密闭贮存。

Buffer S: 细菌原生质制备液, 加入 RNase A 后, 4°C 密闭贮存。

0.25M EDTA: 室温密闭贮存。

Buffer G-A: 裂解液, 室温密闭贮存。

Buffer G-B: 蛋白去除液, 室温密闭贮存。

Buffer DV-A: Buffer DV 的制备液 (请参照实验准备 Buffer DV 的配制方法配制), 室温密闭贮存。

Buffer DV: 相分离液, 室温密闭贮存。

Buffer BV: DNA 结合液, 室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液, 室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前, 按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇 (可用 100%乙醇或 95%乙醇) 并混合均匀, 室温密闭贮存。

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 室温密闭贮存。

二、注意事项

Buffer G-B、Buffer BV 和 Buffer W1 含刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

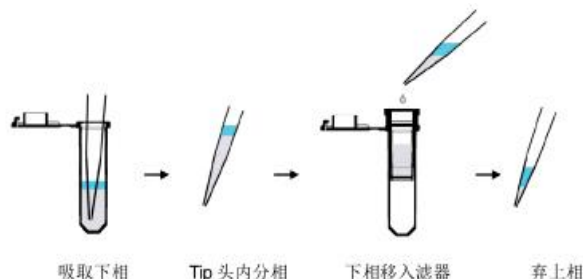
三、实验准备

- 第一次使用时, 在 Buffer W2 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇并混合均匀。
- 准备 Buffer DV: 按 2 ml Buffer DV-A, 125 ml 异丙醇, 75 ml 异丁醇的比例, 加入提供的试剂瓶中, 混合均匀。
- 4°C 预冷 Buffer DV。
- 第一次使用试剂盒时, 用 50%甘油溶解溶菌酶, 使溶菌酶浓度为 50 mg/ml。
- 第一次使用试剂盒时将随试剂盒携带的 RNase A 全部加入 Buffer S 中, 混合均匀。
- 准备 65°C 水浴。
- 检查 Buffer G-A 和 Buffer G-B 是否出现沉淀, 若出现沉淀, 于 65°C 水浴加热至沉淀完全溶解后再使用。

- 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 有利于基因组 DNA 的充分洗脱。

四、操作步骤

- 用 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 收集 1.0×10^9 (1 ml 菌液 OD_{600} 为 1-1.5) 的细菌培养物, $12,000 \times g$ 离心 30 s, 弃尽上清。加 150 μl Buffer S 悬浮沉淀。
*确认 RNase A 已加入 Buffer S 中。
*悬浮需均匀, 不应留有小的菌块, 否则将影响溶菌效果。
- 加 20 μl 溶菌酶贮存液, 混合均匀, 室温静置 5 min。
*如果处理革兰氏阳性菌, 37°C 温浴 30 min。
- 加 30 μl 0.25 M EDTA (pH 8.0), 混合均匀, 冰浴 5 min。
- 加 450 μl Buffer G-A, 漩涡振荡 15 s, 65°C 水浴 10 min。
- 加 400 μl Buffer G-B 和 1 ml Buffer DV (4°C 预冷), 用力混合, $12,000 \times g$ 离心 2 min。
*请在实验前按照实验准备步骤 2 内容, 准备 Buffer DV。
- 尽可能丢弃上相, 保留相间沉淀和下相。加 1 ml 4°C 预冷 Buffer DV 用力混合, $12,000 \times g$ 离心 2 min。
- 丢弃上相, 将下相转移至滤器 (滤器置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中)。 $12,000 \times g$ 离心 1 min。
*上相无需完全弃尽, 在转移无色下相时偶有混入的上相, 可在 Tip 头内迅速分相, 便于丢弃。
*如在转移过程中吸入少量界面沉淀, 不必去除, 可过滤除去。
*有色上相务必除尽, 否则将抑制 DNA 结合到制备管膜上。



- 弃滤器, 在滤液中加 400 μl Buffer BV, 混合均匀。

步骤 9-12 可选择离心法或负压法

A. 负压法

- 9A. 将制备管插到负压装置的插口上, 将步骤 8 中的混合液移入制备管中, 开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱, 吸尽管中溶液。
- 10A. 保持负压, 加 500 μl Buffer W1, 吸尽管中溶液。
- 11A. 保持负压, 沿管壁四周加 700 μl Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次。
*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
*沿管壁四周加入 Buffer W2 有助于彻底冲洗沾附在管壁上的盐份。
*两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除, 消除对酶切反应的影响。
- 12A. 将制备管置于一个 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, $12,000 \times g$ 离心 1 min。

B. 离心法

- 9B. 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中, 将步骤 8 中的混合液移入制备管中, $12,000 \times g$ 离心 1 min。
- 10B. 弃滤液, 将制备管置回到原 2 ml 离心管中, 加 500 μl Buffer W1, $12,000 \times g$ 离心 1 min。

11B. 弃滤液，将制备管置回到原 2 ml 离心管中，加 700 μ l Buffer W2，12,000 \times g 离心 1 min。以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。

*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

*两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

12B. 弃滤液，将制备管置回到原 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

13. 将制备管置于另一洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 100-200 μ l Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000 \times g 离心 1 min 洗脱基因组 DNA。

*将 Eluent 或去离子水加热至 65 $^{\circ}$ C 将提高洗脱效率。

五、流程图

加 150 μ l Buffer S 含 RNase A
加 20 μ l 溶菌酶
加 30 μ l 的 0.25 M EDTA
加 450 μ l Buffer G-A
加 400 μ l Buffer G-B



裂解

加 1 ml Buffer DV
加 1 ml Buffer DV



分相

加 400 μ l Buffer BV



过滤

加 500 μ l Buffer W1
加 700 μ l Buffer W2
加 700 μ l Buffer W2



结合
洗涤

加 100-200 μ l Eluent 或去离子水



洗脱