

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA产量低	使用了不恰当的裂解液,造成裂解不完全	处理材料不要过量。
	有的革兰氏阳性菌裂解比较困难	按照步骤 4 使用 lysostaphin 帮助裂解
	加入蛋白沉淀液后没有充分混匀,DNA 和蛋白质沉淀不能分离开,离心时丢失	参见步骤 9 保证充分混匀
	DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了	异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中,倒弃上清的时候要格外小心,不要把 DNA 沉淀也倒掉了。
A260/A280>1.9	RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染	可以加大 RNA 酶用量或者处理时间延长到 1 小时。
	DNA 剪切断了	严格按照操作步骤,动作不可以太剧烈。
A260/A280 <1.6	蛋白质残留高	保证重复的裂解液用量和时间;看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的解决方法,确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 11,防止蛋白污染。
	测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280	使用 TE 缓冲液来稀释 DNA,保证 PH 值大于 8.0。
	DNA 没有完全溶解	可在 65℃温育帮助重新溶解(不要超过一小时)然后室温或者 4℃放置过夜,期间可以颠倒轻弹帮助溶解。

二、原理简介

本试剂盒用于快速的从各种细菌中提取基因组 DNA。细菌样品加入细胞核裂解液(或者通过溶菌酶或者其它一些酶帮助裂解细胞壁后),首先在强去污剂作用下裂解细胞释放出基因组 DNA,接着加入 RNase A 去除 RNA,然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白,最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶于 DNA 溶解液。

三、试剂盒特点

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂。
2. 快速,简捷,细菌样品操作整个过程可在 1 个小时内完成。
3. 结果稳定,产量高(比离心柱型的产量高一倍以上),OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9,长度可达 50Kb-150kb,可直接用于 PCR, Southern-blot, 文库构建和各种酶切反应。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成,使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机,如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、0.5mol EDTA 和 Lysozyme(用于革兰氏阳性菌)、lysostaphin(用于某些难裂解的革兰氏阳性菌)、水浴箱。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。
4. 本试剂盒为溶液型,可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的细菌细胞量,请联系我们索取其它处理量的操作手册。

五、操作步骤

1. 收集 1 毫升过夜培养细菌加入 1.5 毫升离心管。
2. 9,000rpm 离心 30 秒,使细胞沉淀下来,弃上清,涡旋或轻弹打散细胞沉淀。对革兰氏阳性菌,接步骤 3。**对革兰氏阴性菌,直接接步骤 6。**
3. 加入 480 μ l 50mM EDTA 完全重悬细胞。
4. 加入 120 μ l 溶菌酶(10mg/ml), 混匀。
对于大部分的革兰氏阳性菌如*Bacillus subtilis*,*Micrococcus luteus*,*Arthrobacter luteus*,*Nocardia otitidiscaviarum*,*Rhodococcus rhodochrous*, 和 *Brevibacterium albidium*使用溶菌酶就可以有效裂解。但是对于某些种类的*Staphylococcus*,则应该加入60 μ l溶菌酶(10mg/ml)和60 μ l lysostaphin (10mg/ml)确保有效裂解。
5. 37 $^{\circ}$ C 温育30-60分钟。12,000rpm离心2分钟, 弃上清。
6. 加入600 μ l细胞核裂解液至打散的细胞, 轻柔吹打裂解细胞。
7. 80 $^{\circ}$ C 温育5分钟裂解细胞,然后冷却至室温。
8. 加入RNase A (10mg/ml) 1.8 μ l至裂解物中至终浓度30 μ g/ml。颠倒混匀后37 $^{\circ}$ C 温育15-60分钟去除残留RNA。然后**室温冷却至少5分钟使回复到室温。**
9. 在回复到室温的裂解物内加入200 μ l蛋白沉淀液后,在**涡旋振荡器上高速连续振荡混匀25秒**。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。**冰浴5分钟。**
由于样品体积重量小,用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA, 如果用手振荡混匀, 则不可以用手上下剧烈振荡混匀, 只能适当力度振荡混匀, 否则会剪断基因组 DNA, 但是力度也不能小,要保证充分混匀, 将粘稠的裂解物打散开, 否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开, 离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来, 造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分, 最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议新手还是用涡旋振荡器。
10. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底白色的蛋白沉淀, 也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

11. 小心吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管中。
吸取上清时小心不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀, 如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中, 可再次离心 2 分钟后取上清。
12. 加入等体积的室温异丙醇 (约 600 μ l), 轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状 (丝状) 白色 DNA 沉淀。
注意有时候棉絮状 (丝状) DNA 颠倒混匀的时候, 粘附着在盖子或者管口处, 即使颠倒也不跟下来, 这样导致操作者看不到沉淀, 误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 13, 直接 12,000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 然后接步骤 15。
13. 垂直放置离心管, 让白色 DNA 沉淀自然沉到管底, 然后尽可能多的吸弃大部分的上清, 注意不要吸到沉淀。
14. 加入 1ml70%乙醇后, 颠倒漂洗 DNA 沉淀, 12,000rpm 离心 1 分钟, 在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块, 倒弃上清。
15. 加入 0.5ml70%乙醇, 颠倒几次漂洗 DNA 沉淀, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒去上清 (注意不要把 DNA 沉淀倒掉了), 倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇, 还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇, 空气晾干沉淀几分钟。
注意不要干燥过头, 否则 DNA 极其难溶, 也不能残留太多乙醇, 否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。
16. 加入 100 μ lDNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀, 轻弹管壁混匀, 可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟 (不要超过一小时), 中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA, 中间不时颠倒轻弹帮助溶解。
17. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C,如果要长时间存放, 可以放置在-20 $^{\circ}$ C。