

YALEPIC[®] 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (不含 RNase A) YALEPIC[®] Bacteria Genomic DNA Isolation Kit (No RNase A)

产品货号: YC22013 (50T) ; (试) YC22013 (5T)

产品保存及运输条件:

常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存。

产品概述

YALEPIC[®] Bacteria Genomic DNA Isolation Kit (No RNase A) 适用于从各种来源的细菌 (革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌) 中提取基因组 DNA。本试剂盒采用优化的裂解液及独特的缓冲体系使 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上, 提取过程中无需使用苯酚/氯仿等有毒溶剂, 无需乙醇沉淀, 1 h 内即可获得高纯度 DNA。并可最大限度的去除 RNA、杂蛋白、脂类及其他抑制性杂质, 提取的 DNA 可用于酶切、PCR、Real-Time PCR、印迹杂交、文库构建等多种下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YC22013	(试) YC22013
①	YGT Buffer	15 ml	1.5 ml
②	YG Buffer	15 ml	1.5 ml
③	Wash Buffer GA	13 ml	3 ml
④	Wash Buffer GB	16 ml	6 ml
⑤	YGE Buffer	15 ml	1.5 ml
⑥	Proteinase K	1.2 ml	120 μ l
⑦	Pure Columns YM with Collection tubes	50 T	5 T

适用范围

$10^6 \sim 10^8$, 最多不超过 2.0×10^9 个革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌。

自备试剂及仪器

无水乙醇; 100 mg Lysozyme (YALI#YX27006) (革兰氏阳性菌); Nuclease-free 移液器吸头; 1.5 ml Nuclease-free 离心管; 高速离心机; 恒温水浴锅; 涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施, 穿戴实验服、手套、口罩等。
2. 首次使用前 **Wash Buffer GA**、**Wash Buffer GB** 前, 应按照试剂瓶标签加入无水乙醇; 试用装 (5T) 中 **Wash Buffer GA**、**Wash Buffer GB** 已含无水乙醇, 使用后请立即盖好瓶盖防止乙醇挥发。
3. 使用前请检查 **YGT**、**YG Buffer** 中是否有晶体析出, 如有晶体析出, 可放置 56°C 水浴锅使晶体溶解, 溶解混匀后使用。
4. 如需单独除去 RNA, 可在加入 **YG Buffer** 之前加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 DNase-Free 的 RNase A 溶液 (YALI#YX27001), 振荡混匀。
5. 如果提取的基因组属于次生代谢产物或细胞壁厚的细菌培养物, 建议在对数生长期早期收集样品。
6. 如果提取样品为革兰氏阳性菌, 需配制**溶菌酶缓冲液**。(注: Lysozyme 干粉需在缓冲液中进行配制, 否则会导致酶失活, 具体工作缓冲液配制方法为: 20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA, pH 8.0; 1.2% Triton X-100。121°C 灭菌处理 20 min, 加入适量的 Lysozyme, 使其终浓度为 20 mg/ml。详细配方见 (YALI#YX27006))

实验流程

● 样本处理

A. 革兰氏阴性菌样本处理

1. 取细菌培养物 1 ~ 5 ml ($10^6 \sim 10^8$ 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管 (自备) 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
2. 向沉淀中加入 180 μ l **YGT Buffer**, 振荡使菌体重悬。
3. 加入 20 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀, 56°C 孵育, 直至溶液变清亮, 过程中每隔一段时间颠倒或振荡离心管使样本分散。(注: 如需单独除去 RNA, 可加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 DNase-Free 的 RNase A 溶液, 振荡混匀, 室温放置 10 min)
4. 向管中加入 200 μ l **YG Buffer**, 涡旋振荡混匀。加 200 μ l 无水乙醇 (自备), 涡旋振荡充分混匀, 瞬时离心收集溶液。(注: 如产生白色沉淀, 不影响后续实验)

B. 革兰氏阳性菌样本处理

1. 取细菌培养物 1 ~ 5 ml ($10^6 \sim 10^8$ 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管 (自备) 中, 12,000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。

2. 向沉淀中加入 180 μ l **溶菌酶缓冲液 (自制)** , 振荡使菌体重悬, 37°C 孵育 30 min。 (注: 大部分细菌水浴 30 min 后已充分破壁, 但某些细胞壁较厚的细菌, 如金黄色葡萄球菌需要处理 1 ~ 2 h 才能完全破壁。可根据不同类别的细菌, 适当调整水浴时间)
3. 先向管中加入 20 μ l **Proteinase K**, 涡旋混匀。再加入 200 μ l **YG Buffer**, 涡旋振荡混匀。56°C 孵育 30 min。(注:如需单独除去 RNA,可加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 DNase-Free 的 RNase A 溶液, 振荡混匀, 室温放置 5 ~ 10 min)
4. 加入 200 μ l 无水乙醇 (自备) , 涡旋振荡混匀, 瞬时离心收集溶液。

● 柱式纯化

1. 将所得全部溶液加入已装收集管的吸附柱 (**Pure Columns YM with Collection tubes**) 中, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放回管中。
2. 向吸附柱中加入 500 μ l **Wash Buffer GA** (使用前检查是否加入无水乙醇) ,12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。
3. 向吸附柱中加入 500 μ l **Wash Buffer GB** (使用前检查是否加入无水乙醇) ,12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。重复该步骤一次。
4. 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 彻底晾干。 (注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
5. 将吸附柱置于一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 50 ~ 200 μ l **YGE Buffer**, 室温放置 2 ~ 5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集溶液, -20°C 长期保存。

注:

- 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用 ddH₂O 洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0 ~ 8.5, pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。
- 2) 如果要提高 DNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 5。
- 3) 如要增加产量, 可用新的 50 ~ 200 μ l YGE Buffer/ddH₂O 进行洗脱。
- 4) YGE Buffer/ddH₂O 可在 56°C 提前预热, 滴加至膜中后, 室温静置 2 ~ 5 min。



常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
DNA 产量低	1. 样品量少	细菌培养后浓度低, 可适当增加细菌用量。
	2. 革兰氏阳性菌破壁不完全	可适当增加 Lysozyme 的用量或延长酶消化时间。
	3. 洗脱不充分	洗脱液需加至吸附膜中央位置, 增加洗脱体积或增加洗脱次数, 预热洗脱液。
	4. 试剂使用错误	Wash Buffer GA、Wash Buffer GB 使用前需加入指定量无水乙醇。
DNA 纯度低	1. 样品裂解不充分	重新取样, 使其与 YGT Buffer 充分混匀, 如样本量过多, 可适当减少用量。
	2. 乙醇残留	增加晾干时间, 确保乙醇彻底挥发。
柱子堵塞	1. 样品用量过多	减少样品用量, 样品用量小于 1.0×10^9 个细菌。
	2. 消化液有杂质	样品消化后溶液中存在明显的颗粒物质, 可于 12,000 rpm 离心 2 ~ 3 min 去除未消化的物质。

本产品仅供研究使用, 请勿用于临床诊断。