



ELK Biotechnology
For research use only.

Bacterial DNA Extraction kit

细菌 DNA 提取试剂盒说明书

货号	规格	储藏/有效期
EP021-50T	50T	室温/一年
EP021-200T	200T	室温/一年

产品介绍

本产品适合从 1-5 ml 细菌培养物中分离纯化总 DNA。细菌经溶菌酶破壁处理后, 被 Buffer BL-1 溶解, 再经 Buffer BL-2 沉淀去除蛋白和细胞碎片, 离心上清中的基因组 DNA 可结合到纯化柱上。经过 Buffer RP 和 Buffer WB 的洗涤, 去除残留在膜上的蛋白与 PCR 抑制物后, 基因组 DNA 用 Buffer TE 洗脱, 并可立即用于扩增、酶切、测序、建库等各种分子生物学实验。

试剂盒组成

成分	EP021-50T	EP021-200T	Storage
Buffer BL-1	15 ml	60 ml	RT
Buffer BL-2	15 ml	60 ml	RT
Buffer TE	15 ml	60 ml	RT
溶菌酶	550 mg	2200 mg	-20°C
Buffer WB	40 ml	160 ml	RT
Buffer RP	30 ml	120 ml	RT
吸附柱	50 套	200 套	RT
说明书	1 份	1 份	RT

一、用户需自备的试剂与物品

1. 去离子纯水和无水乙醇。
2. 移液器及吸头 (为避免样品间的污染, 推荐选用含有滤芯的移液器吸头)
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机 (可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子)
5. 水浴锅和旋涡震荡器



ELK Biotechnology

For research use only.

二、使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 37°C，并将 Buffer TE 温育至 37°C。
3. 根据一次提取的细菌标本数（按每个标本需加 100 μ l 溶菌酶溶液计算）配制适量的 100mg/ml 的溶菌酶溶液：比如要提取 6 个标本的细菌基因组 DNA，则称取 65mg 溶菌酶干粉，加入 650 μ l 去离子纯水配制成 650 μ l 溶菌酶溶液。
4. 注意：反复冻融溶菌酶溶液对其活性影响极大，如果一次配制了较多的溶菌酶溶液，应分装成小份于 -20°C 储存，解冻使用后的溶菌酶溶液如有剩余，应予以丢弃，不可再次冻存。
5. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer RP 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。

三、操作步骤

1. 用 1.5 ml 离心管收集 1-5 ml 细菌培养物，加入 200 μ l **Buffer TE**，旋涡震荡充分悬浮细菌。

注意：

某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如 MRS 培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入 1ml 蒸馏水，旋涡震荡悬浮细菌后 12000 rpm 离心 30 秒，弃蒸馏水上清，再加入 200 μ l Buffer TE，旋涡震荡充分悬浮细菌。

细菌收集方法：

悬浮培养的细菌：12000rpm 离心 30 秒收集 1~5 ml 细菌培养物中的细菌，弃培养基。

培养皿中的单菌落：在 1.5ml 离心管中加入 **200 μ l Buffer TE**，用接种环刮取菌落，将细菌洗脱在 Buffer TE 中。

2. 加入 **100 μ l 溶菌酶溶液**，旋涡振荡约 15 秒混匀，37°C 水浴 30-60 分钟。

注意：

大部分细菌水浴 30 分钟后已经充分破壁，但是某些细胞壁较厚的细菌（比如金黄色葡萄球菌）需要处理 1-2 小时才能完全破壁。请根据不同类别的细菌适当调整水浴时间。

3. 加入 **225 μ l Buffer BL-1**，旋涡振荡 30 秒。

注意：

如果从新鲜培养的细菌中提取 DNA，可能会将细菌中的部分 RNA 一起分离纯化出来，但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验。如果要彻底除去 RNA，可在本步骤中按照 1: 200 加入 RNase A 储存液（10 mg/ml，本试剂盒不提供）。

4. 加入 **225 μ l Buffer BL-2**，剧烈摇晃离心管 3~5 次，再旋涡振荡 30 秒混匀。

5. 13000 rpm 离心 2 分钟。

6. 将步骤 5 中的上清液倒入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

7. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 **500 μ l Buffer RP**，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。



ELK Biotechnology

For research use only.

注意：确认在Buffer RP中已经加入无水乙醇。滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

8. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入**600 μ l Buffer WB**，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

注意：确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

9. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，14000 rpm 离心1分钟。

10. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml 离心管中，在纯化柱中央加50~100 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育的**Buffer TE**，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm 离心30秒。

11. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

四、DNA 浓度及纯度检测

得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA、40 μ g/ml 单链 DNA。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

五、注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
2. 所有离心步骤均为使用台式离心机，室温下离心。

六、常见问题及解答

A、堵柱子：

建议：请将样本裂解充分，无明显絮状物后，进行下一步操作；如有明显絮状物，请离心后小心吸取上清，以免堵塞吸附柱。

B、基因组提取得率低：

建议：同等比例增加样本用量和 BL-1/BL-2 的用量，以增加基因组得率。

C、Buffer 中有沉淀未溶解

建议：Buffer 在温度较低时会出现沉淀，使用前请检查是否有沉淀生成，如有沉淀生成，请置于 37 $^{\circ}$ C 温育片刻，待溶液澄清后使用。

D、Wash Buffer 中未按要求加入乙醇

建议：按照说明书要求加入要求量的无水乙醇，使用后旋紧瓶盖，防止乙醇挥发。



ELK Biotechnology

For research use only.

E、溶解体积及时间的选择

建议：溶解体积将会影响最终的收获量，溶解体积越大，收获量越高，但是浓度将会降低。请使用试剂盒推荐的溶解体积进行溶解，以保证最好的收获量和浓度。建议：加入 Buffer TE 后，室温放置 2~5 min，更有利于溶解。

F、有 RNA 污染

建议：在步骤 3 按 1:200 加入本公司的 RNaseA，以防止 RNA 污染。