

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:革兰氏阴性细菌 DNA 提取	5
方案 2:革兰氏阳性细菌 DNA 提取	7
方案 3:组织或液体样品中提取细菌 DNA	9
方案 4:从拭子样品中提取细菌 DNA	11
常见问题回答	12

版本: 2018-01

简介

HiPure Bacterial DNA Kit 为革兰氏阴性和阳性细菌 DNA 提取提供了可靠的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。试剂盒适合于从小于 $<1.5 \times 10^9$ 个细菌中提取高纯度的 DNA，也适合从组织、血液、分泌液或拭子等样品提取得到寄生的微生物 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。该方案得到的 DNA 包括有基因组 DNA 和质粒 DNA。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Bacterial DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。细菌经溶菌酶消化去除细胞壁，某些细菌还可加入玻璃珠涡旋破壁，然后在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer TE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、酶切、Southern blot 等实验。

组 成

HiPure Bacterial DNA Kit

产品编号	D3146-01	D3146-02	D3146-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Glass Beads (0.1~0.2mm)	3 g	20 g	90 g
Buffer STE Plus	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer SDS	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer DL	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer AE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Lysozyme	10 mg	90 mg	400 mg
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
说明书	1	1	1

版本: 2018-11

保 质 期

HiPure Bacterial DNA Kit 除 Proteinase K、RNase A 和 Lysozyme 外,可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer SDS 可能会有沉淀形成,需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K, RNase A, Lysozyme 干粉室温运输和保存,收到试剂盒后保存于-20~8℃。

需要准备材料和工具

- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。

D3146-01	加入 0.33 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-02	加入 0.6 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-03	加入 3.0 ml Protease Dissolve Buffer

- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须保存于-20℃。

D3146-01	加入 0.3 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-02	加入 0.6 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-03	加入 3.0 ml Protease Dissolve Buffer

- Lysozyme 的配制(50mg/ml): Lysozyme 以干粉提供, 使用前须加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解, 使其终浓度为 50mg/ml。溶解后, 分装保存于 2-8℃ 或-20℃。

D3146-01	加入 0.2 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-02	加入 1.8 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-03	加入 8 ml Protease Dissolve Buffer

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。

D3146-01	加入 8.4 ml 无水乙醇
D3146-02	加入 17 ml 无水乙醇
D3146-03	每瓶中加入 84 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3146-01	加入 24 ml 无水乙醇
D3146-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3146-03	加入 200 ml 无水乙醇

方案 1. 革兰氏阴性细菌 DNA 抽提

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 个革兰氏阴性细菌中提取总 DNA。细菌数量可以通过分光光度计进行测量。 1OD_{600} 约为 1.5×10^9 个革兰氏阴性细菌。

- 转移 0.5-1.5ml 细菌培养液($<5 \times 10^8$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液。
若培养液密度比较大，离心速度和离心时间都可能需要提高，以保证细菌的充分沉淀收集。若需从菌斑中提取 DNA：用接种环刮下菌斑，按步骤 2 进行操作，并把菌斑转移至 Buffer STE，涡旋混匀。
- 加入 220 μ l Buffer STE Plus、30 μ l Lysozyme 和 10 μ l RNase A 至细菌沉淀团中。** 涡旋充分重悬细菌，室温静置 10 分钟。
处理多个样品时，Buffer STE、Lysozyme 和 RNase A 可预先按比例预先混合，若不需要去除 RNA，无需加入 Lysozyme 和 RNase A。
- 加入 250 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至细菌重悬液中。** 涡旋混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 10 分钟。
Buffer DL 和 Proteinase K 不能预先混合，否则蛋白酶会变性失活。
- 加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液中。** 涡旋混匀 15 秒。
这一步若有絮状沉淀出现，用移液枪吸打几次尽量打散沉淀。
- 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 4 步获得的混合液(包括沉淀)转移至柱子中。 $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。
若柱子出现堵塞，提高离心速度至 $13,000 \times g$ ，离心 3 分钟。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。
Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。 $10,000 \times g$ 离心 2 分钟。

9. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~100 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子膜中央。**放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
若需获得的最高产量，建议进行第二次洗脱。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 2. 革兰氏阳性细菌 DNA 抽提

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 革兰氏阳性细菌中提取总 DNA。细菌数量可以通过分光光度计进行测量。 1OD_{600} 约为 1.5×10^9 个革兰氏阳性细菌。革兰氏阳性细胞的细胞壁很厚，不能直接进行裂解。需通过溶菌酶消化去除细胞壁。革兰氏阳性细菌和大部分的革兰氏阳性细菌如杆菌，通过酶法处理就可达到良好的破壁效果。

- 转移 0.5-1ml 培养液($<5 \times 10^8$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液。

若培养液密度比较大，离心速度和离心时间都可能需要提高，以保证细菌的充分沉淀收集。若需从菌斑中提取 DNA：用接种环刮下菌斑，按步骤 2 进行操作，并把菌斑转移至 Buffer STE/溶菌酶中，涡旋混匀。
- 加入 220 μ l Buffer STE、30 μ l Lysozyme 和 10 μ l RNase A 至细菌沉淀团中。** 涡旋充分重悬细菌，室温静置 20 分钟。

处理多个样品时，Buffer STE、Lysozyme 和 RNase A 可预先按比例混合。处理葡萄球菌属的细菌时，再加入 1 μ l Lysostaphin(20mg/ml)。
- (可选：难裂解菌株) 加入 150~200mg 玻璃珠至样品中，** 高速涡旋混匀 5~10 分钟进一步裂解细菌。静置 1 分钟后，转移上清至新的离心管中。
- 加入 250 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中。** 颠倒混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 15 分钟。
- 10,000 $\times g$ 离心 3 分钟去除未消化的杂质，转移上清液至新的离心管中。
- 加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液或上清液中。** 涡旋混匀 15 秒。

这一步若有明显的絮状沉淀，用移液枪吸打几次尽量打散沉淀。
- 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移第五步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。

若柱子出现堵塞，提高离心速度至 13,000 $\times g$ ，离心 3 分钟。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。** $10,000 \times g$ 离心 1 分钟。

Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子膜中央。**放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
处理 DNA 含量很低的样品无需第二次洗脱。若需获得的最高产量，建议进行第二次洗脱。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 3: 组织/液体样品中提取寄生细菌 DNA

该方案适合于从各种动物组织、血液、分泌物等液体样品中提取宿主 DNA 和寄生细菌 DNA。得到的 DNA 可直接用于细菌检测。若需从粪便样品中提取细菌 DNA, 我们推荐使用 HiPure Stool DNA Kit。

1. 根据需求, 选择方案 A 进行细菌 DNA 富集处理, 或按方案 B 直接提取总 DNA:

方案 A(富集提取细菌 DNA)

- a). **组织类样品:** 取 50~100mg 样品, 加入 1ml Buffer PBS 或生理盐水进行充分匀浆, 静置 1 分钟后, 取 500 μ l 上清至 1.5ml 离心管中, 加入 150 μ l Buffer DL 颠倒混匀, 静置 10 分钟后, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 第 2 步进行操作。
- b). **全血/细胞悬液:** 取 0.5~1ml 抗凝血液, 加入 2 倍体积灭菌水和 1 倍体积 Buffer DL, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- c). **分泌物或体液类等:** 取分泌物或体液, 加入 0.2 倍体积的 Buffer DL, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细胞和细菌; 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- d). **粘稠的分泌物:** 取 0.1~1g 痰液等, 用胰蛋白酶将痰液进行充分液化, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- e). **拭子样品:** 取拭子至 2ml 离心管中, 加入 1ml Buffer PBS 或生理盐水, 加入 150 μ l Buffer DL, 涡旋混匀 15 秒, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃溶液, 保留拭子和沉淀, 按第 2 步进行操作。

方案 B(总核酸提取 DNA)

- a). **组织类样品:** 取 10~20mg 组织类样品, 尽量剪碎后转移至 1.5ml 离心管中, 加入 10 μ l Proteinase K 和 230 μ l Buffer STE Plus 和 20 μ l Buffer SDS, 55 $^{\circ}$ C 消化 30~60 分钟, 加入 5 μ l RNase A, 按 3 步进操作。
- b). **全血类样品:** 取 0.5~1ml 抗凝血液或液体样品, 加入 3 倍体积灭菌水和 0.1 倍体积的 Buffer DL, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌和细胞。吸弃上清, 余 150 μ l 残液和沉淀, 加入 10 μ l

Proteinase K 和 100 μ l Buffer STE Plus 和 20 μ l Buffer SDS, 55 $^{\circ}$ C 消化 30 分钟, 加入 5 μ l RNase A, 按 3 步进操作。

c). **分泌物或体液类等**: 取 300 μ l 分泌液, 加入 30 μ l Buffer SDS 和 10 μ l Proteinase K, 55 $^{\circ}$ C 消化 30 分钟, 加入 5 μ l RNase A, 按 3 步进操作。

2. **加入 220 μ l Buffer STE Plus、30 μ l Lysozyme 和 10 μ l RNase A 至细菌沉淀团中。** 涡旋重悬细菌, 室温放置 20 分钟。
3. **加入 150~200mg 玻璃珠至样品中,** 最高速度涡旋混匀 5~10 分钟进一步裂解细胞壁。静置 1 分钟后转移 250 μ l 上清至新的离心管中。
若需彻底去除 RNA, 这一步加入 5 μ l RNase A。
4. **加入 250 μ l Buffer DL 至样品中,** 颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C 水浴消化 10 分钟。
5. **加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液中。** 涡旋混匀 15 秒
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000 \times g 离心 1 分钟。
7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。** 10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
9. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心 2 分钟。
10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子膜中央。** 放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
处理 DNA 含量很低的样品无需第二次洗脱。若需获得的最高产量, 建议进行第二次洗脱。
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 4：从拭子中提取细菌总 DNA

该方案适合于从各种拭子样品基因组 DNA 和总细菌 DNA。

1. 转移拭子样品至 2ml 离心管中。**加入 350 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme 至拭子样品中。**涡旋混匀，室温静置 20 分钟。
处理多个样品时，Buffer STE 和 Lysozyme 可按比例预先混合。处理葡萄球菌属的细菌时，再加入 1 μ l Lysostaphin(20mg/ml)。
2. **加入 400 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至细菌重悬液中。**涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 水浴消化 20 分钟。
3. 转移 600~800 μ l 裂解液至新的离心管中。
4. **(可选) 加入 150~200mg 玻璃珠至样品中，**最高速度涡旋混匀 5~10 分钟进一步裂解细胞壁。静置 1 分钟后转移上清至新的离心管中。
5. **加入 0.5 倍体积的无水乙醇至裂解液中。**涡旋混匀 15 秒。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**把余下的混合液转移至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子膜中央。**放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
需要离心去除不消化物质	若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 xg 离心 5 分钟去除未消化的物质。
样品用量太多	减少样品用量。
DNA 产量低	
细菌数量计算不对	用平板算法计算细菌数量
柱子堵塞	参照上述情况
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
RNA 污染	
延长 RNase 消化时间	延长 RNase 消化时间
OD260/OD280 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNase 酶消化，或延长 RNase 酶的消化时间
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于 -20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
加入 Buffer DL 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer DL 后立即颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀。
Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。