

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	蛋白酶 K 失效了	收到蛋白酶 K 后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。
	裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀	加入结合液后, 和加入蛋白酶 K 后立即 剧烈颠倒轻摇混匀 。 加入异丙醇后应该和裂解物 剧烈颠倒轻摇混匀 才加入吸附柱, 如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。
	有的革兰氏阳性菌需要特殊的酶裂解	请详细参见步骤 3, 了解提取细菌的特性
未提取到 DNA	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇	确保做了步骤 12, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。
	使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液	仔细阅读步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。
	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤 12, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。

二、原理简介

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶, 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 60 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9, 长度可达 30Kb-50kb, 可直接用于 PCR, Southern-blot 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 的带 50ml 转子的传统台式离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70°C 备用。
3. 对于革兰氏阳性菌, 需要自备 lysozyme, 或者 lysostaphin。
4. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, **避免沾染皮肤, 眼睛和衣服**。若沾染皮肤、眼睛时, **要用大量清水或者生理盐水冲洗**。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在 25ml 漂洗液 WB 中加入 100ml 无水乙醇!

1. 取 5-20 毫升培养菌液 (最多不超过 2×10^{10} 个细胞), 10,000rpm, 离心 10 分钟左右, 弃上清, 收集菌体, 尽可能的吸净上清。
起始处理量可以根据细菌密度, 细胞种类, 预期产量进行调整, 但是离心吸附柱最大吸附能力 250 μ g 基因组 DNA, 如果菌体过量超过最大吸附能力, 反而会严重降低产量。
2. 加入 2ml 缓冲液 RB 重悬洗涤细胞, 移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。
3. 对于革兰氏阴性菌 (可选做此步骤): 加入 50 μ l lysozyme (10mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。
对于革兰氏阳性菌: 加入 500 μ l-1000 μ l lysozyme (10mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟。10,000rpm 离心 2 分钟, 弃上清后将细胞振荡或者吹打重悬于 2ml 缓冲液 RB 中。
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 250 μ l 溶菌酶 (10mg/ml) 和 250 μ l lysostaphin (10mg/ml) 确保有效裂解。
4. 可选做步骤: 如果 RNA 残留较多, 需要去除 RNA, 可以加入 200 μ l RNase A (25mg/ml) 溶液, 振荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。
5. 加入 2ml 结合液 CB, 立刻剧烈颠倒轻摇充分混匀, 再加入 200 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液, 充分混匀, 70 $^{\circ}$ C 放置 15 分钟。
6. 将上步所得的混合液加入到过滤柱中, 低速 (4000rpm 左右) 离心 5 分钟, 收集下滤液。
7. 下滤液冷却后加入 1ml 异丙醇, 剧烈颠倒轻摇充分混匀, 此时可能

会出现絮状沉淀。

8. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 10,000 rpm 离心 3 分钟, 倒掉收集管中的废液。
上述各步骤中适当力度充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量, 必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 秒混匀。
9. 加入 5ml 抑制物去除液 IR, 10,000 rpm 3 分钟, 弃废液。
10. 加入 7ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 10,000 rpm 离心 3 分钟, 弃掉废液。
11. 加入 5ml 漂洗液 WB, 10,000 rpm 离心 3 分钟, 弃掉废液。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 10,000 rpm 离心 5 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 1-1.5ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热), 室温放置 3 分钟, 12,000 rpm 离心 3 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 3 分钟。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 500 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
14. 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。