

## 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:细菌 DNA 提取(酶法)-----	5
方案 2:细菌 DNA 提取(酶法加珠磨)-----	6
方案 3:从生物样品中提取总 DNA (含细菌) -----	8
方案 4:从生物样品中富集提取细菌 DNA -----	10
常见问题回答-----	12

版本: 2024-10

## 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	D3146-01B	D3146-02B	D3146-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
塑料小勺子	2 个	4 个	10 个
Glass Beads (0.1~0.6mm)	8 g	40 g	200 g
Buffer STE Plus	5 ml	30 ml	100 ml
Buffer DL	5 ml	30 ml	100 ml
Buffer GV1*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GV2*	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer AE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Lysozyme	10 mg	90 mg	400 mg
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 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

Buffer AE 成分: 10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

版本: 2024-01

## 保 质 期

HiPure Bacterial DNA Kit 除 Proteinase K、RNase A 和 Lysozyme 外, 可在室温下(15-25°C) 干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。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°C。

## 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°C。

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°C 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须保存于-20°C。

D3146-01	加入 0.6 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-02	加入 1.2 ml Protease Dissolve Buffer
D3146-03	加入 6.0 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°C 或-20°C。

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. 细菌 DNA 抽提 (酶法)

该方案采用溶菌酶消化法，适合革兰氏阴性以及对溶菌酶敏感的细菌中提取 DNA。

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液，以减少加液次数，混和液可以 2-8°C 放置 1 周。一份样品：310 $\mu$ l Buffer STE Plus、30 $\mu$ l Lysozyme 和 10 $\mu$ l RNase A。

### 1. 样品前处理

- **革兰氏阴性细菌：**转移 0.5-1.8ml 革兰氏阴性细菌培养液 ( $<1\times10^9$ )、发酵液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、液化液、体液等液体类样品至 2.0ml 离心管中，13,000  $\times g$  离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液或液体。加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture，涡旋重悬细菌。
- **革兰氏阳性细菌：**转移 0.5-1.8ml 菌液 ( $<1\times10^9$ )、发酵液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、体液、痰液液化液等液体样品至 2.0ml 离心管中，13,000  $\times g$  离心 1 分钟收集细菌，倒弃培养液或液体。加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture，涡旋重悬细菌。
- **直接裂解：**取 300 $\mu$ l 细菌培养液、发酵液、拭子浸泡液、体液至 2.0ml 离心管中，加入 30 $\mu$ l Lysozyme 和 10 $\mu$ l RNase A，颠倒混匀，按第二步进行操作。

### 2. 室温放置 10~30 分钟消化细胞壁，其间颠倒混匀数次。

阴性细菌，室温放置~10 分钟，阳性细菌放置 10~30 分钟。

3. 加入 200 $\mu$ l Buffer DL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中，涡旋混匀 5 秒，65°C 温育 30 分钟。
4. 13,000  $\times g$  离心 3 分钟去除未颗粒的物质，转移 0.5ml 上清液至新的离心管中。若消化液是澄清的，可以省略这一步。
5. 加入 0.5 倍无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 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。

7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入  $500\mu\text{l}$  Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。 $10,000 \times g$  离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入  $650\mu\text{l}$  Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。 $10,000 \times g$  离心 1 分钟。
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  $1.5\text{ml}$  离心管中。加入  $30\sim100\mu\text{l}$  预热至  $70^\circ\text{C}$  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  $2\sim8^\circ\text{C}$ ，长期保存需保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

若需获得的最高产量，建议进行第二次洗脱。

## 方案 2. 难提取细菌 DNA 抽提 (酶法加珠磨)

该方案采用溶菌酶消化和珠磨双重裂解法，适合从各种革兰氏阴性或阳性细菌样品提取 DNA，包括难提取的葡萄球菌和念珠菌。

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液以减少加液次数，该混和液可以  $2\sim8^\circ\text{C}$  放置 1 周。一份样品： $310\mu\text{l}$  Buffer STE Plus、 $30\mu\text{l}$  Lysozyme 和  $10\mu\text{l}$  RNase A。
- 1. 转移  $0.5\sim1.8\text{ml}$  细菌培养液 ( $<1\times10^9$ )、发酵液、拭子浸泡液、匀浆液、积液、体液、痰液液化液等液体类样品至  $2.0\text{ml}$  离心管中， $13,000 \times g$  离心 3 分钟收集细菌，倒弃液体，加入  $350\mu\text{l}$  Lysis Mixture。  
直接裂解：取  $300\mu\text{l}$  细菌培养液、发酵液、拭子浸泡液或体液至  $2.0\text{ml}$  离心管中，加入  $100\mu\text{l}$  Lysis Mixture，颠倒混匀，按第二步进行操作。
- 2. 加入一勺玻璃珠 ( $0.1\sim0.6\text{mm}$ ) 至样品中，高速涡旋混匀 10 分钟（或珠磨仪上珠磨  $30\sim60$  秒）裂解细菌。
- **涡旋仪：** 推荐使用美基涡旋仪 MagMix A。这台涡旋仪带  $2\text{ml}$  离心管的夹具，可一次

高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用，使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中，让管子间的摩擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。

- **Powerlyzer 珠磨仪：**建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - **FastPrep24 珠磨仪：**建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - **Tissue lysis II 珠磨仪：**建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer DL 和 20 $\mu$ l Proteinase K，涡旋混匀，70°C温育 10 分钟。
  4. 13,000  $\times$  g 离心 3 分钟，转移 0.5ml 上清液至新的离心管中。
  5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至上清液，涡旋混匀 5 秒。
  6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 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。
  7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  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 30~100 $\mu$ l 预热至 70°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°C，长期保存需保存于-20°C。
- 若需获得的最高产量，建议进行第二次洗脱。

### 方案 3：从生物样品中提取总 DNA (含宿主细胞 DNA)

该方案适合于从各种动植物组织、血液、分泌液、痰液、体液等生物样品中提取宿主 DNA 和寄生细菌 DNA，得到的 DNA 可直接用于细菌检测。

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液以减少加液次数，该混和液可以 2-8°C 放置 1 周。一份样品：310 $\mu$ l Buffer STE Plus、30 $\mu$ l Lysozyme 和 10 $\mu$ l RNase A。

#### 1. 根据样品类型收集细菌 DNA:

- 动植物组织:** 取 50~100mg 冻存或新鲜的动植物组织，加入 1.0~1.5ml 生理盐水或 PBS 进行充分匀浆，静置 1~3 分钟沉淀去除大颗粒后，转移上清液至 2ml 离心管中，13,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集微生物，倒弃上清液，加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture。
  - 全血:** 取 0.5ml 全血至离心管中，加入 3 倍红细胞裂解液 (10  $\times$  Buffer RBC) 裂解红细胞，500  $\times$  g 离心 5 分钟沉淀去除白细胞。转移 1.5~1.8ml 上清液至 2.0ml 离心管中，13,000  $\times$  g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃上清液，加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture。
  - 分泌物或体液类等:** 取适量体积的血清、血浆、拭子浸泡液、唾液，积液、灌洗液等液体样品，13,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集细胞和细菌，倒弃上清液，加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture 重悬，转移至 2.0ml 离心管中。
  - 痰液:** 取适量痰液，加入 4 倍体积的新鲜制备的 0.1% DTT，涡旋混匀 10 秒，室温放置 15~30 分钟，期间要不断涡旋震荡，直至团块消失，痰液全部匀质化。取适量的液化液至离心管中，10,000  $\times$  g 离心 3 分钟收集细菌，倒弃上清液，加入 350 $\mu$ l Lysis Mixture，涡旋重悬后，转移至 2ml 离心管中。
  - 深加工食品:** 干燥类食品用打粉机打磨成粉末，取 100-200mg 粉末至 2.0ml 离心管中，加入 0.3ml 生理盐水或灭菌水，然后再加入 0.35ml Lysis Mixture。
  - 干拭子样品:** 取干拭子至 2ml 离心管中，去除多余的手柄，加入 0.2ml 灭菌水或生理盐水，然后再加入 0.35ml Lysis Mixture。
- 加入一勺玻璃珠 (0.1-0.6mm) 至样品中，高速涡旋混匀 10~15 分钟 (或珠磨仪**

上珠磨 30~60 秒) 裂解细菌。

- **涡旋仪:** 推荐使用美基涡旋仪 MagMix A 或高效的水平式涡旋仪 MagMix B。这两台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具, 可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用, 使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中, 让管子间的摩擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。
  - **PowerLyzer 珠磨仪:** 建议 2000rpm 珠磨 30 秒, 暂停 30 秒, 再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - **FastPrep24 珠磨仪:** 建议 5m/s, 珠磨 30 秒, 暂停 30 秒, 再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - **Tissue Lysis II 珠磨仪:** 建议 25Hz 珠磨 5 分钟, 重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer DL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 颠倒混匀, 65°C 消化 20 分钟。
  4. 13,000  $\times$  g 离心 3 分钟去除未颗粒的物质, 转移 0.5ml 上清液至新的离心管中。
  5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液或上清液, 涡旋混匀 5 秒。
  6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 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。
  7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  9. 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 30~100 $\mu$ l 预热至 70°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°C, 长期保存需保存于-20°C。
- 若需获得的最高产量, 建议进行第二次洗脱。

## 方案 4：从组织或全血样品富集提取细菌 DNA

该方案适合于从各种动植物组织、血液、分泌液、体液等液体样品富集提取寄生细菌 DNA，并有效减少体细胞 DNA 干扰。得到的 DNA 可直接用于细菌检测。

- **配制 Lysis Mixture:** 按比例制备混匀液以减少加液次数，该混和液可以 2-8°C 放置 1 周。一份样品：260 $\mu$ l Buffer STE Plus、30 $\mu$ l Lysozyme 和 10 $\mu$ l RNase A。

### 1. 根据样品的类型进行细菌富集处理：

a). **动植物组织：**取 30~100mg 冻存或新鲜的动植物组织，加入 1.5ml 生理盐水或 PBS 进行充分匀浆，静置 1 分钟沉淀去除大颗粒后，转移 1.0ml 上清液至 2ml 离心管中，加入 0.25ml Buffer DL，颠倒混匀，室温放置 10 分钟裂解真核细胞，13,000  $\times$  g 离心 10 分钟收集微生物，倒弃上清液，加入 300 $\mu$ l Lysis Mixture。

b). **全血：**取 0.5ml 全血至离心管中，加入 3 倍红细胞裂解液 (10  $\times$  Buffer RBC) 裂解红细胞，500  $\times$  g 离心 5 分钟沉淀去除白细胞。转移 1.5ml 上清液至 2.0ml 离心管中，加入 0.2ml Buffer DL，颠倒混匀，室温放置 10 分钟裂解白细胞。13,000  $\times$  g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃上清液，加入 300 $\mu$ l Lysis Mixture。

c). **分泌物或体液类：**取 1.0ml 血清、血浆、拭子浸泡液、唾液，积液、灌洗液等液体样品，加入 0.25ml Buffer DL，颠倒混匀，室温放置 10 分钟，13,000  $\times$  g 离心 10 分钟收集细菌，倒弃上清液，加入 300 $\mu$ l Lysis Mixture 重悬，转移至 2.0ml 离心管中。

### 2. 加入一勺玻璃珠 (0.1-0.6mm) 至样品中，高速涡旋混匀 10~15 分钟 (或珠磨仪上珠磨 30~60 秒) 裂解细菌。

- **涡旋仪：**推荐使用美基涡旋仪 MagMix A 或高效的水平式涡旋仪 MagMix B。这两台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。实验室常用的涡旋仪或带振荡功能的恒温金属浴也可以使用，使有恒温金属浴时需要 2ml 离心管中，让管

子间的磨擦力防止管子无效旋转减少珠磨效果。

- **Powerlyzer 珠磨仪:** 建议 2000rpm 珠磨 30 秒, 暂停 30 秒, 再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - **FastPrep24 珠磨仪:** 建议 5m/s, 珠磨 30 秒, 暂停 30 秒, 再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - **Tissue lysis II 珠磨仪:** 建议 25Hz 珠磨 5 分钟, 重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer DL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 涡旋混匀 5 秒, 70°C 温育 10 分钟。
  4. 13,000  $\times$  g 离心 1 分钟去除未颗粒的物质, 转移 0.5ml 上清液至新的离心管中。
  5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液或上清液, 涡旋混匀 15 秒。
  6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 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。
  7. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  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 20~50 $\mu$ l 预热至 55~70°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°C, 长期保存需保存于-20°C。

若需获得的最高产量, 建议进行第二次洗脱。

## 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
<b>柱子堵塞</b>	
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。
<b>DNA 产量低</b>	
细菌数量计算不对	用平板计算法计算细菌数量
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。
<b>RNA 污染</b>	
延长 RNASE 消化时间	延长 RNase 消化时间
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
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°C。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。