D3350 Bacterial DNA Kit

√实验前请按说明书正确配制和保存以下溶液。

➢ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存。

货号	加入量
D3350-00	6mL
D3350-01	60mL
D3350-02	80mL（每瓶）

➢ 使用【Elution Buffer】对 Lysozyme 进行溶解，溶解后至于-20℃保存。

货号	加入量
D3350-00	100μl
D3350-01	1mL
D3350-02	1mL（每瓶）

➢ 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存。

货号	加入量
D3350-00	1.2mL
D3350-01	10mL
D3350-02	32mL

E.Z.N.A. Bacterial DNA Spin Protocol

1. 这个操作方案可以最多从 3mL 过夜培养的 LB 培养基提取细菌的基因组 DNA。在 LB 培养基中过夜培养需要提取基因组 DNA 的细菌。
2. 收集≤3mL 菌液，室温、4000×g 离心 10min，沉淀细菌。
3. 弃培养基，加入 100μl 的 TE Buffer 重悬细菌，然后加入 10μl Lysozyme，37℃水浴 10min。

   注意：可以根据所提取细菌细胞壁的强度对所加的溶菌酶的总量或者对水浴的时间进行优化，保证细菌能够完全地进行破壁。适当地延长水浴时间可以产生更好的效果。
4. （选做）样品为革兰氏阳性细菌，加 25mg 的玻璃珠，在室温条件下高速涡旋 5min。静置让玻璃珠沉淀下来，转移上清液至新的 1.5mL 的离心管中。
5. 加入 100μl BTL Buffer 和 20μl Proteinase K Solution 涡旋混匀。将样品放置在 55℃水浴摇床中以完全裂解。一般 1 个小时左右就可以将完全溶解完细菌。如果没有水浴摇床的仪器，水浴期间，每隔 20-30min 拿出涡旋一下。

6. 加入 5μl RNase A 并反复颠倒混匀，在室温条件下孵育 5min。
7. 室温条件下，10000×g 离心 2min，沉淀不溶解的物质，小心地转移上清液到新的离心管中，其间避免吸到有不溶解的沉淀。
8. 加入 220μl BDL Buffer，涡旋混匀，65℃孵育 10min。在加入 Buffer BDL 后，可能会有絮状沉淀出现，但它并不影响 DNA 的复性。
9. 加入 220μl（96%—100%）的无水乙醇，高速涡旋 20 秒，如果这时候有沉淀出现，用枪头反复吹打 10 次以破碎沉淀。
10. 将 HiBind® DNA Mini 结合柱套在一个 2mL 收集管上，将步骤 9 所得到的所有液体转至于柱子内，其中包括在步骤 9 过程中形成的沉淀，室温 10000×g 离心 1min，弃收集管和滤液。
11. 将 HiBind® DNA Mini 结合柱套在新的 2mL 收集管上，加入 500μl 的 HBC Buffer，室温 10000×g 离心 1min，弃滤液。
12. 将 HiBind® DNA Mini 结合柱套在同一个 2mL 收集管上，加入 700μl DNA Wash Buffer，室温 10000×g 离心 1min，弃滤液。
13. 重复步骤 12。
14. 将 HiBind® DNA Mini 结合柱套在同一个 2mL 收集管上，高速离心 2min（≥10000×g）以干燥 HiBind® DNA Mini 结合柱的基质。该步骤是用来除去可能会影响下游实验的乙醇。
15. 将 HiBind® DNA Mini 结合柱套在 1.5mL 离心管上，加入 50-100μl 预热至 65℃ Elution Buffer，室温下放置 3-5min。
16. 室温 10000×g 离心 1min，洗脱基因组 DNA。
17. 重复步骤 15-16，加入预热至 65℃ Elution Buffer，进行二次洗脱以提高产率。注意：每 50-100μl 洗液代表柱子上 DNA 结合量的 60%-70%，按此计算，两次洗脱可以得到柱子 DNA 结合量的 90%。但是，增加洗液会降低终产物的浓度，为了得到高浓度的 DNA，可以用 50μl 的体积进行洗脱，如果用低于 50μl 的体积进行洗脱，会影响 DNA 的产率。在日常的一些实验中表明，用加有 Elution Buffer 的硅胶柱在 70℃孵育，可以增加产量。

E.Z.N.A. Bacterial DNA Vacuum Protocol

1. 根据 E.Z.N.A. Bacterial DNA Spin Protocol 中的步骤（步骤 1-9）制取样品。
2. 根据制造商的说明书安装好真空抽滤器，并将 V-spin 连接到真空抽滤器上。
3. 将样品、BDL Buffer、乙醇的混合物加到 HiBind® DNA Mini 结合柱中，打开抽滤器，让液体从真空抽滤器中滤过后，关闭真空抽滤器。

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn

4. 加 500μl 的 HBC Buffer 洗涤 HiBind® DNA Mini 结合柱，打开抽滤器，让 HBC Buffer 从真空抽滤器中滤过。
5. 加 700μl 的 DNA Wash buffer 洗涤 HiBind® DNA Mini 结合柱，打开抽滤器，让 DNA Wash Buffer 从真空抽滤器中滤过。用 700μl 的 DNA Wash buffer 重复该操作。
6. 根据 E.Z.N.A. Bacterial DNA Spin Protocol 中步骤 14-17 的方法进行操作。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准

中国区总代理:广州飞扬生物工程有限公司 | 技术支持 020-32051125 | QQ:800848200 | omegabiotek.com.cn