

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	5
方案 2: 难裂解细菌 DNA 提取	7
方案 3: 组织或液体样品中富集提取细菌 DNA	9
方案 4: 从拭子样品中提取细菌 DNA	10
方案 5: 从痰液中提取总 DNA	11
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	D3146-01	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 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: 2023-02

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℃。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. 细菌 DNA 抽提（酶法）

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 个细菌培养物、食品发酵液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、体液、全血、细胞等样品中提取细菌 DNA 和细胞 DNA。

1. 根据样品类型进行前处理：

沉淀富集：转移 0.5-2.0ml 菌液、菌斑(用湿拭子取样)、发酵液，体液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、体液等样品至 2.0ml 离心管中。13,000 x g 离心 3 分钟收集细菌，倒弃液体。加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme，涡旋重悬细菌。

简易操作：直接转移 250 μ l 菌液、发酵液、体积、拭子浸泡液、体液、重悬液、匀浆液等样品至 1.5ml 离心管中，加入 50 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme 混匀。

菌斑：用棉签或接种环刮下菌斑，加入 300 μ l Buffer STE 和 30 μ l Lysozyme 重悬。

拭子：把拭子转移于 2.0ml 离心管，加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme 混匀。

组织：取 10-30mg 组织块至 1.5ml 离心管中，加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme，用电动匀浆器或玻璃匀浆器进行匀浆。

全血：取 0.2~0.5ml 全血，加入 3 倍淋巴细胞分离液（Buffer RBC, C521）裂解红细胞，10,000 x g 离心 5 分钟收集细菌和白细胞，倒弃上清液。加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme 混匀。

痰液：用 DTT 液化痰液，10,000 x g 离心 5 分钟收集细菌，加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l Lysozyme 混匀。

革兰氏阴性细菌：若只需要提取革兰氏阴性细菌，无需加入 Lysozyme 和静置时间，直接取 300 μ l 菌液或离心后用 300 μ l Buffer STE Plus 重悬后，按第三步进行操作。

2. 室温或 37°C 放置 15 分钟消化细胞壁，其间颠倒混匀数次。

3. 加入 200 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至细菌重悬液中。涡旋混匀，65°C 水浴消化 20 分钟。

4. 加入 10 μ l RNase A，颠倒混匀，室温放置 10-15 分钟降解 RNA。

处理拭子浸泡液、积液或体液样品，因细胞含量少，RNA 并不丰富，可以省略这一步。

5. (可选) 10,000 × g 离心 3 分钟去除未颗粒的物质, 转移上清液至新的离心管中。
处理菌液、拭子浸泡液、积液或体液样品, 因细胞含量少且无沉渣的样品, 可以省略这一步。若消化液澄清无颗粒物, 也可以省略这一步。
6. 加入 250µl 无水乙醇至裂解液中, 涡旋混匀 5 秒。
无水乙醇是上清液体积的 0.5 倍。
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 6 步获得的混合液(包括沉淀)转移至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
若柱子出现堵塞, 提高离心速度至 13,000 × g, 离心 3 分钟。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。
10,000 × 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 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。
10,000 × 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. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30-50µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。
放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 再加入 30~50µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存 2-8°C, 长期保存需保存于-20°C。

方案 2. 难提取细菌 DNA 抽提（酶法加珠磨）

该方案适合于从细菌培养物、食品发酵液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、体液、全血、细胞等样品中提取难裂解细菌和细胞 DNA。该方案采用溶菌酶和玻璃珠珠磨一起作用，对葡萄球菌和结核杆菌等难裂解细菌有高效裂解和提取效果。

1. 根据样品类型进行前处理：

沉淀富集：转移 0.5-2.0ml 菌液、菌斑(用湿拭子取样)、发酵液、体液、拭子浸泡液、组织匀浆液、积液、体积等样品至 2.0ml 离心管中。13,000 x g 离心 3 分钟收集细菌，倒弃液体。加入 350µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme，涡旋重悬。

简易操作：直接转移 300µl 菌液、发酵液、体积、拭子浸泡液、体液、重悬液、匀浆液等样品至 1.5ml 离心管中，加入 50µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme 混匀。

菌斑：用棉签或接种环刮下菌斑，加入 350µl Buffer STE 和 30µl Lysozyme 重悬。

拭子：把拭子转移于 2.0ml 离心管，加入 350µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme 混匀。

组织：取 10-30mg 组织块至 1.5ml 离心管中，加入 350µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme，用电动匀浆器或玻璃匀浆器进行匀浆。

全血：取 0.2~0.5ml 全血，加入 3 倍淋巴细胞分离液（Buffer RBC, C521）裂解红细胞，10,000 x g 离心 5 分钟收集细菌和白细胞，倒弃上清液。加入 350µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme 混匀。

痰液：用 0.1% DTT 液化痰液，13,000 x g 离心 5 分钟收集细菌，加入 350µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme 混匀。

2. 室温或 37°C 放置 15 分钟消化细菌细胞壁，其间颠倒混匀数次。

3. 加入~0.3g(约 250µl) 玻璃珠至样品中，高速涡旋混匀 10 分钟（或珠磨仪上珠磨 30~60 秒）进一步裂解细菌。

若无珠磨仪时，推荐使用 MagMix A. MagMix A 涡旋仪带来夹具，一次可处理 24 个样品。

4. 加入 200µl Buffer DL 和 10µl Proteinase K，颠倒混匀，65°C 消化 20 分钟。

5. 加入 10µl RNase A 至样品中，颠倒混匀，室温放置 10-15 分钟降解 RNA。

处理拭子浸泡液、积液或体液样品，因细胞含量少，RNA 并不丰富，可以省略这一步。

6. (可选) 10,000 × g 离心 3 分钟去除未颗粒的物质，转移上清液至新的离心管中。

处理菌液、拭子浸泡液、积液或体液样品，因细胞含量少且无残渣的样品，可以省略这一步。若消化液澄清无颗粒物，也可以省略这一步。

7. 加入 250µl 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。

无水乙醇是上清液体积的 0.5 倍。

8. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 6 步获得的混合液(包括沉淀)转移至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。

若柱子出现堵塞，提高离心速度至 13,000 × g，离心 3 分钟。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。

10,000 × 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。

10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。

10,000 × 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。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。

12. 将柱子装在 1.5ml 离心管中。加入 30-50µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。

放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

13. 再加入 30~50µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g

离心 1 分钟。

14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C。

方案 3：组织/液体样品中富集提取细菌 DNA

该方案适合于从各种动物组织、血液、分泌液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，进行富集处理：

- a). **组织类样品：**取 30~50mg 样品，加入 1ml Buffer PBS 或生理盐水进行充分匀浆，加入 200 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 抗凝血液或体液样品，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 或生理盐水和 200 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。

2. 加入 400 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~250mg 玻璃珠至样品中，最高速度涡旋混匀 10 分钟进一步裂解细胞壁。
4. 静置 1 分钟后，转移 250 μ l 上清液至新的离心管中。
5. 加入 250 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中，颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C 水浴消化 10 分钟。
6. 加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液中。涡旋混匀 10 秒。
7. 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。

8. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**
10,000 × 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 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
10,000 × 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 × g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 30~50µl 预热至 65°C Buffer AE 至柱子膜中央。**
放置 3 分钟。10,000 × 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°C，长期保存需保存于-20°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 500µl Buffer STE Plus 和 30µl Lysozyme 至拭子样品中。**涡旋混匀，室温静置 10 分钟。
2. **加入 500µl Buffer DL 和 10µl Proteinase K 至细菌重悬液中。**涡旋混匀，70°C 水浴消化 15 分钟。
3. **转移消化液至新的离心管中，加入 0.5 倍无水乙醇至裂解液中，**涡旋混匀 5 秒。
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半混合液至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**转移余下的混合液至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
10,000 × 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。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 200µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
10,000 × g 离心 2 分钟。

8. 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。
9. 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 5：痰液的液化和总 DNA 提取

该方案适合于从各种痰液样品提取细胞和细菌 DNA。

1. 转移适合的痰液至 15-50ml 离心管中，加入 4 倍体积的 0.1% DTT (新鲜配制)，涡旋混匀 15 秒，室温放置 15 分钟，期间要不断涡旋震荡，直至团块消失，痰液全部匀质化。
2. 取 1.0~1.8ml 液化液至 2.0ml 离心管，13,000 \times g 离心 5 分钟，吸弃上清液。
3. **加入 300 μ l Buffer STE Plus 和 30 μ l lysozyme 混匀，室温静置 15 分钟。**
4. 加入~0.3g(约 250 μ l) 玻璃珠至样品中，高速涡旋混匀 10 分钟（或珠磨仪上珠磨 30~60 秒）进一步裂解细菌。
若无珠磨仪时，推荐使用 MagMix A. MagMix A 涡旋仪带来夹具，一次可处理 24 个样品。
5. **加入 200 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K，涡旋混匀，65 $^{\circ}$ C 水浴消化 20 分钟。**
6. **加入 0.5 倍无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。**
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**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 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 300 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**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。
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。

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。
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。