



柱式法细菌基因组 DNA 提取试剂盒 说明书

货 号:

TRS0728-050

TRS0728-200



一、试剂盒简介

本柱式法细菌基因组 DNA 提取试剂盒，利用能够特异性结合 DNA 的离心吸附柱与精心研发的独特缓冲液体系，能够从细菌样本中高效地提取基因组 DNA。离心吸附柱内的硅基质材料，对 DNA 具有高效吸附性能，有效去除蛋白质杂质以及其他有机化合物，确保提取出的 DNA 片段完整、纯度高，且质量稳定可靠，能为后续实验提供坚实保障。

提取所得的 DNA 适用于多种常见的分子生物学实验操作，包括但不限于酶切分析、聚合酶链式反应（PCR）、文库构建以及 Southern 杂交等。

二、提取得率

材料	提取量	DNA 得量
细菌培养液	$10^6 \sim 10^8$ cells	5~20 μ g

三、试剂盒规格及组分

组分名称	TRS0728-050	TRS0728-200
缓冲液 A	15 mL	50 mL
裂解液 B	15 mL	50 mL
蛋白漂洗液 D	10 mL	40 mL
漂洗液 W	12 mL	48 mL
洗脱液	12 mL	60 mL
蛋白酶 K	1 mL	4 $\times$ 1 mL
吸附柱 C	50	200
收集管(2 mL)	50	200

四、保存与运输条件

保存条件：试剂盒所有组分应在室温 15~30℃的干燥环境下储存，保质期为 12 个月。若试剂盒中的溶液出现沉淀，使用前将其置于 37℃水浴中预热 10 分钟，待沉淀完全溶解后，充分摇匀即可使用，会影响实验效果。

运输条件：试剂盒常温运输。

五、注意事项

1. **首次使用准备:** 首次开启试剂盒时, 需依据试剂瓶标签的指示, 在蛋白漂洗液 D 和漂洗液 W 中准确加入无水乙醇。
2. **样本处理:** 样本应避免反复冻融, 反复冻融可能会导致 DNA 片段断裂变小, 降低 DNA 的提取量, 影响实验结果。
3. **缓冲液处理:** 若缓冲液 A 或裂解液 B 中出现沉淀, 可将其放入 37°C 水浴中, 待沉淀完全溶解后, 充分振荡摇匀再使用, 以保证缓冲液的均一性和有效性。
4. **离心操作:** 整个实验过程中的所有离心步骤, 均需使用台式离心机, 并在室温条件下进行离心, 严格按照规定的转速和时间操作, 确保实验的准确性和重复性。

六、操作步骤

1. 收集菌体:

取 1~5mL 细菌培养液, 将其转移至离心管中, 使用台式离心机, 以 10000 rpm (约 11500×g) 的转速离心 1 分钟。离心结束后, 小心地尽量吸净上清液, 避免吸到沉淀的菌体。

2. 菌体重悬:

向离心管中的菌体沉淀加入 200μL 缓冲液 A, 通过振荡的方式使菌体充分重悬, 确保菌体与缓冲液 A 均匀混合。

- ✚ 对于破壁难度较大的革兰氏阳性菌, 可跳过此步骤, 直接进行破壁处理。具体方法为: 向菌体沉淀中加入 110 μL 特定缓冲液 (该缓冲液由 20 mM Tris、pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton 组成), 再加入 70 μL 溶菌酶溶液 (50 mg/ml, 需客户自行准备), 然后将离心管置于 37°C 环境下处理 30 分钟以上。
- ✚ 如果实验需要去除 RNA, 可在重悬液或处理后的溶液中加入 5μL RNA 酶 A (10 mg/ml) 溶液 (客户自备), 振荡 15 秒, 室温放置 5 分钟, 即可实现 RNA 的去除。

3. 蛋白酶 K 处理:

向重悬后的菌液中加入 20 μL 蛋白酶 K 溶液, 使用移液器轻轻吹打或涡旋振荡, 使蛋白酶 K 与菌液充分混匀。

4. 细胞裂解:

向含有蛋白酶 K 的菌液中加入 200 μL 裂解液 B, 加入后立即充分颠倒混匀, 使裂解液 B 与菌液充分接触。然后, 将离心管放入 70°C 的水浴中放置 10 分钟。在这个过程中, 溶液应逐渐变为清亮状态。10 分钟后, 取出离心管进行瞬时离心, 以去除管盖内壁的水珠。

注: 加入裂解液 B 时, 溶液中可能会产生白色沉淀, 这属于正常现象。通常情况下, 在 70°C 水浴放置时, 沉淀会逐渐消失, 不会对后续实验造成影响。但如果溶液在 70°C 水浴 10 分钟后仍未变清亮, 这表明细菌细胞裂解不彻底。细胞裂解不彻底可能会导致提取的 DNA 量减少, 并且提取出的 DNA 纯度也会受到影响, 含有较多杂质。

5. 乙醇处理:

向经过细胞裂解的溶液中加入 200 μL 无水乙醇, 加入后迅速充分振荡混匀 15 秒。此时, 溶

液中可能会出现絮状沉淀，这是正常的反应现象。振荡混匀后，进行瞬时离心，去除管盖内壁的水珠。

6. 吸附柱吸附：

将上一步所得的溶液及絮状沉淀全部转移至吸附柱 C 中（注意吸附柱需预先放入收集管中）。将装有样本的吸附柱放入离心机，以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 30 秒。离心结束后，小心倒掉收集管中的废液，然后将吸附柱 C 放回原收集管中。

7. 蛋白漂洗液 D 洗涤：

向吸附柱 C 中加入 500 μL 蛋白漂洗液 D（在使用前，请务必检查蛋白漂洗液 D 中是否已按要求加入无水乙醇）。加完蛋白漂洗液 D 后，将吸附柱放入离心机，以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 30 秒。离心结束后，倒掉收集管中的废液，再将吸附柱 C 放回收集管。

8. 漂洗液 W 洗涤：

向吸附柱 C 中加入 600 μL 漂洗液 W（使用前同样要检查是否已加入无水乙醇）。然后，以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 30 秒，倒掉废液后，将吸附柱 C 放回收集管。重复此洗涤步骤一次。

9. 干燥吸附柱：

将经过两次漂洗液 W 洗涤后的吸附柱 C 放回收集管中，以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 2 分钟，尽量去除吸附柱中的残留液体。离心结束后，将吸附柱 C 从收集管中取出，置于室温下放置数分钟，使吸附材料中残余的漂洗液彻底挥发干燥。

注：此干燥步骤至关重要，因为漂洗液中的乙醇残留会对后续的酶反应实验（如酶切、PCR 等）产生抑制作用，影响实验结果的准确性，所以务必确保吸附柱充分干燥。

10. DNA 洗脱：

将干燥后的吸附柱 C 转移至一个新的离心管中。使用移液器向吸附膜的中间部位悬空滴加 50~200 μL 洗脱液。室温放置 2~5 分钟，使洗脱液与吸附膜上的 DNA 充分接触，促进 DNA 的洗脱。然后，以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 2 分钟，此时含有 DNA 的洗脱液会被收集到离心管中。

注：洗脱缓冲液的体积不应少于 50 μL，若体积过小，会导致洗脱不充分，影响 DNA 的回收效率。洗脱液的 pH 值对洗脱效率影响显著，若使用 ddH₂O 作为洗脱液，应确保其 pH 值在 7.0~8.5 之间。当 pH 值低于 7.0 时，洗脱效率会明显降低。此外，为了提高基因组 DNA 的得率，可将第一次离心收集到的洗脱液再次加入吸附柱 C 中，室温放置 2 分钟后，再次以 12,000 rpm（约 13,400×g）的转速离心 2 分钟，进一步回收 DNA。DNA 产物应储存于 -20℃的环境中，以防止 DNA 降解，确保其稳定性。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。