

细菌基因组 DNA 纯化试剂盒

(硅胶膜柱法) 使用说明书

【产品名称】

中文名称：细菌基因组 DNA 纯化试剂盒（硅胶膜柱法）

英文名称：Bacterial DNA purification kit（Silica membrane）

【包装规格】50 份/盒

【产品编号】TQ001D0

【产品简介】

用于细菌基因组 DNA 的小量提取，其原理是利用细胞裂解释放基因组 DNA；随后利用蛋白酶 K 降解膜蛋白和缠绕 DNA 的核蛋白，使 DNA 充分游离；硅胶膜离心过滤可逆吸附基因组 DNA；洗除蛋白质、脂质等杂质后，用洗脱液洗脱获得高纯度基因组 DNA。使用本试剂盒提取的 DNA 可用于各种常规分子实验操作，包括酶切、PCR、分子杂交等实验。

【储存条件及有效期】

室温保存，有效期一年，2~8°C 条件下储存更佳。储存过程中若溶液产生沉淀，使用前将其在室温放置一段时间或 37°C 条件下温育，待充分溶解后摇匀即可使用。

溶菌酶和蛋白酶 K 溶解后，和 RNase 一起 -20°C 存放。

【样本类型】

新鲜细菌培养液或菌落悬浮液。

【试剂盒组成】

| 序号 | 产品组成 | 规格 |
|----|------------|------------------------|
| 1 | 悬浮液 | 17.5 mL |
| 2 | 裂解液 | 15 mL |
| 3 | 去蛋白缓冲液 | 24 mL（使用前加 16 mL 无水乙醇） |
| 4 | 漂洗液 | 15 mL（使用前加 60 mL 无水乙醇） |
| 5 | 洗脱液 | 10 mL |
| 6 | DNA 硅胶膜吸附柱 | 50 套 |
| 7 | 蛋白酶 K | 干粉 |
| 8 | 蛋白酶 K 配置液 | 1 mL |
| 9 | 溶菌酶 | 干粉 |
| 10 | 溶菌酶配置液 | 4 mL |

| | | |
|----|-------|--------|
| 11 | RNase | 220 μL |
| 12 | 使用说明书 | 1 份 |

【提取得率】

1 mL 纯培养菌液对数生长期的菌液（ $10^7 \sim 10^9$ cells）基因组 DNA 的提取量分别为：革兰氏阴性菌 6~25 μg，革兰氏阳性菌为 6~15 μg；OD_{260/280}=1.7~1.9。

【使用方法】

- 初次使用前请在去蛋白缓冲液和漂洗液中加入无水乙醇，参见瓶身标签或使用说明书。
 - 将蛋白酶 K 的粉末倒入蛋白酶 K 配置液中，涡旋振荡充分混匀，浓度为 20 mg/mL。
 - 将溶菌酶干粉倒入溶菌酶配置液瓶中，涡旋振荡充分混匀，浓度为 20 mg/mL。
1. 吸取 1~2 mL 对数生长期细菌培养液于 1.5 mL 离心管中。12,000 r/min 离心 1 min，尽量吸除上清。
 2. 中收集的菌体沉淀加入 120 μL 悬浮液，充分悬浮后加入 80 μL 溶菌酶和 4 μL RNase A 溶液，震荡混匀后，37°C 水浴 10~30 min。
 - （革兰氏阴性菌水浴 10~15 min，革兰氏阳性菌水浴 20~30 min；若是难提取的葡萄球菌属细菌可加入 1 μL 溶葡酶（20 mg/mL）一起水浴。溶葡酶需客户自行购买）
 - 对于难裂解的细菌如芽孢杆菌和葡萄球菌等，可把悬浮液用量增加至 320 μL，和酶水浴后，加入 200 mg 左右玻璃珠（0.1~0.2 mm）高速涡旋 10 min 以进一步裂解细菌。静置 1 min，取 200 μL 上清液至新的离心管中，再进行下一步。（玻璃珠需客户自行购买）
 3. 加入 220 μL 裂解液和 20 μL 蛋白酶 K，立即涡旋振荡混匀，65°C~70°C 水浴或金属浴 10~15 min，溶液形成清亮的悬浮液。
 - 先加裂解液再加蛋白酶 K，避免蛋白酶 K 活性减弱。
 - 裂解液加入后会产生白色沉淀，一般水浴或金属浴后会消失，不会影响后续提取。如溶液未变清亮，说明细菌裂解不彻底，可能导致 DNA 提取量减少或不纯。如提取菌体超过 1.5 mL，可适当延长温育时间。
 - （可选）12,000 r/min 离心 1 min 去除未裂解完

全菌体，转移上清液至新的离心管中。

- 加入 220 μL 无水乙醇，振荡混匀，此时可能出现白色絮状沉淀，简短离心将内壁的液体离心到管底。
- 将所得的溶液和絮状沉淀全部加入 DNA 硅胶膜吸附柱上（吸附柱套入收集管中），12,000 r/min 离心 1 min，倒掉滤液，吸附柱套回收集管。
 - 溶液中基因组 DNA 吸附在硅胶膜上，如发生堵塞，说明提取的菌体过量，应适当减少菌量或延长离心时间，直到所有的溶液顺利离心到收集管中为止。
- 加入 500 μL 去蛋白缓冲液，12,000 r/min 离心 1 min，倒掉滤液，吸附柱套回收集管。
 - 去蛋白缓冲液初次使用前加入 16 mL 无水乙醇。
- 加入 500 μL 漂洗液，12,000 r/min 离心 1 min，倒掉滤液，吸附柱套回收集管。
 - 漂洗液初次使用前加入 60 mL 无水乙醇。
- 再次加入 500 μL 漂洗液，12,000 r/min 离心 1 min，倒掉滤液，吸附柱套回收集管，再次 12,000 r/min 离心 1 min，彻底去除吸附柱中残留的液体，室温放置 2 min，去除残留的乙醇。
- 将吸附柱套入新的 1.5 mL 无菌的离心管中，向吸附柱中央处悬空滴加 50~100 μL 洗脱液，室温静置 5 min，12,000 r/min 离心 2 min，离心得到的液体转移到无菌的 EP 管中， -20°C 保存待用。
 - 洗脱液可用无菌去离子水替代，但 pH 值应在 8.0~8.5。
 - 将洗脱液预热到 60°C 使用，可提高基因组 DNA 得率。
 - 为提高基因组 DNA 提取得率，可将洗脱得到的溶液再次吸出滴加到吸附柱中央，静置几分钟后再次离心收集。

【纯度及浓度检测分析】

- 提取得到的细菌基因组 DNA 片段可用紫外分光光度计测量浓度与纯度。
- DNA 在 OD₂₆₀ 处有明显的吸收峰，在此条件下，1 OD 值的光密度相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；单链 DNA 或

RNA 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；寡核苷酸为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

- OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.7~1.9，如果 A₂₆₀/A₂₈₀≤1.7 或比值过低，表示受到蛋白（芳香族）或酚类物质污染，需要纯化样品。若 DNA 样品中 A₂₆₀/A₂₈₀≥2.0 表明样品有 RNA 或 DNA 降解。
- 洗脱液使用去离子水时候，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 会偏低，但不表示纯度低。

【注意事项】

- 本试剂盒提取使用的器皿、移液器等均应为专用，离心管、枪头等一次性耗材需进行高压灭菌。操作人员应穿戴洁净工作服、口罩、帽子、使用一次性无粉手套。
- 使用新鲜培养的菌液，确保提取的基因组 DNA 不被降解。
- 加入悬浮液后应充分悬浮菌液，以免影响提取效果。
- 裂解液注意不要直接接触皮肤，如有接触请用大量清水冲洗。
- 去蛋白缓冲液和漂洗液使用后盖紧盖子，以免乙醇挥发影响抽提效果。
- 基因组 DNA 需长期保存，建议使用洗脱液洗脱，分装保存于 -20°C 或 -80°C 。
- 请严格按照本说明书操作步骤进行，不同批号的试剂若无特殊说明，请勿混合使用，并保证在有效期内使用该试剂盒，因操作不当导致的基因组 DNA 提取效果不佳，本公司概不负责。
- 妥善处理所有样本和试剂材料，彻底清洁和消毒操作台面。

【生产企业】

企业名称：广东环凯生物科技有限公司

生产地址：肇庆高新技术产业开发区科技大街中 13 号

邮政编码：526238

销售热线：0758-3680999 转 8001

技术热线：0758-3680999 转 8018

企业网址：<http://www.bhkbio.com>

【说明书修改时间】2024 年 06 月 17 日