

## 细菌 DNA 提取试剂盒

### E.Z.N.A.<sup>®</sup> Bacterial DNA Kit

货号	D3350-00	D3350-01	D3350-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind <sup>®</sup> DNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
BTL Buffer	1.5 mL	20 mL	50 mL
BDL Buffer	2 mL	20 mL	50 mL
HBC Buffer	3 mL	25 mL	80 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 20 mL
Glass Beads	150 mg	2 g	8 g
Elution Buffer	5 mL	15 mL	60 mL
Lysozyme	5 mg	50 mg	4 x 50 mg
Proteinase K Solution	140 $\mu$ L	1.4 mL	4 x 1.4 mL
RNase A	30 $\mu$ L	275 $\mu$ L	1.1 mL
User Manual	✓	✓	✓

#### ★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. Proteinase K Solution 室温可放置 12 个月，长期保存建议放置 2-8°C；
3. Lysozyme 溶解后需要放置 -20°C 保存；
4. RNase A 长期保存放置 2-8°C；
5. 当贮存温度较低时，BTL Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
6. 本试剂盒仅限科学研究使用。

## ★ 实验前准备

1. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	DNA Wash Buffer 稀释	HBC Buffer 稀释
	无水乙醇 加入量	异丙醇 加入量
D3350-00	8 mL	1.2 mL
D3350-01	60 mL	10 mL
D3350-02	80 mL (每瓶)	32 mL

2. 按照下表加入 Elution Buffer 溶解 Lysozyme。溶解后放置-20℃保存。

货号	Elution Buffer 加入量
D3350-00	100μL
D3350-01	1 mL
D3350-02	1 mL (每管)

## 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇、TE Buffer 或灭菌水
- ✓ 温度可达 37℃、55℃、65℃的孵育装置
- ✓ 涡旋仪
- ✓ 带标准接口的多头真空抽滤装置

## ★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 在 LB 培养基中培养细菌至对数期(通常情况下可以使用过夜培养)；室温 4,000 xg 离心 10 min 收集 < 3ml 或是  $1 \times 10^9$  个细菌，弃除培养基；
2. 加入 100 μL TE Buffer 或灭菌水，涡旋重悬菌团；
3. 加入 10 μL Lysozyme, 37℃孵育 10min；

# 注意：所需酶量及孵育时间可能需要根据所使用的菌株进行修改。细胞壁的完全消化对于有效的裂解是必不可少的，是有需要可适当延长孵育时间至 30min。

# **可选:** 对于难裂解的细菌按照以下短步骤进行操作:

- 1) 加 25 mg Glass Beads 到样品管中, 高速涡旋 5min;
  - 2) 将样品静置待玻璃珠沉淀于管底;
  - 3) 转移上清液至一新的 1.5 mL 离心管中。
4. 加入 100  $\mu$ L BTL Buffer 和 20  $\mu$ L Proteinase K Solution, 涡旋充分混匀;
  5. 于水浴锅中 55°C 孵育。

# **注意:** 细菌裂解时间通常不超过 1 小时, 如果使用的水浴锅不带震动混匀功能, 每隔 20-30min 对样品涡旋混匀一次。

6. 加入 5  $\mu$ L RNase A, 颠倒混匀, 室温放置 5min;
7. 室温 10,000xg 离心 2min 去除不溶的杂质;
8. 转移上清液到新的 1.5mL 离心管中, 小心注意不要打散转移到任何沉淀;
9. 加入 220  $\mu$ L BDL Buffer, 涡旋混匀, 65°C 孵育 10min;

# **注意:** 加入 BDL Buffer 后可能会形成絮状沉淀。

10. 加入 220  $\mu$ L 无水乙醇, 涡旋彻底混匀;
11. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套入收集管中, 转移第 10 步得到的混合液到结合柱中, 室温 12,000xg 离心 1min, 弃滤液;
12. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套入收集管中, 加入 500 $\mu$ L HBC Buffer (已加异丙醇正确稀释) 至结合柱中, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液;

# **注意:** HBC Buffer 在使用前必须按照说明书用异丙醇进行稀释。

13. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套回收集管中, 加入 700 $\mu$ L DNA Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中, 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;

# **注意:** DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

14. 重复步骤 13 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;
15. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns 套回收集管中, 12,000xg 离心空甩 2min;
16. 将 HiBind DNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100 $\mu$ L 65°C 预热的 Elution Buffer 至结合柱中, 室温放置 3-5min, 然后 10,000xg 离心 1min 洗脱 DNA;

17. 重复步骤 16 进行二次洗脱, 产物放置 -20°C 保存。

- 确保 Elution Buffer 准确加入到结合膜中央;
- 一次 50-100  $\mu$ L 洗脱可获得 60-70% 的 DNA, 二次洗脱可以达到 90%。

- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）。
- 为了获得更高浓度的 DNA，可以使用 50  $\mu$ L Elution Buffer 进行洗脱（会稍微降低总 DNA 产量）。体积低于 50  $\mu$ L 会大大降低产量。
- 可以在加入 Elution Buffer 后，至于 65°C 孵育来提高洗脱效率。

## ★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

1. 按照第 2-3 页“离心方案”的步骤 1-10 准备好裂解结合液；
2. 按英文使用说明准备好真空抽滤器，把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 连接到抽滤器；
3. 转移裂解液到 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column，小心不要超过结合柱的容积（700  $\mu$ L），用真空抽滤让裂解液通过结合柱，转移剩下的裂解液到结合柱，抽滤，直到所有的裂解液都通过结合柱；
4. 加 500 $\mu$ L HBC Buffer（已加异丙醇稀释）到 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column，抽滤让液体流过结合柱；
5. 洗涤结合柱：加 700 $\mu$ L DNA Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），抽滤；
6. 重复步骤 5，进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
7. 弃去滤液，把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新装回收集管，最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质；
8. 把 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上，加入 50-100 $\mu$ L Elution Buffer 到结合柱基质中，静置 2min，13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA；
9. 将洗脱的 DNA 保存在 -20°C。



更多详情，请扫描左方二  
维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意  
事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：[omegabiotek.com.cn](http://omegabiotek.com.cn)

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取