

# 细胞（细菌）DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

## 【预期用途】

细胞（细菌）DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从培养细胞或革兰氏阴性细菌中分离纯化基因组 DNA。

## 【检验原理】

在裂解吸附液和蛋白酶 K 的作用下细胞基因组 DNA 与蛋白质分离，在裂解吸附液高盐低 pH 的环境下，吸附柱内的硅胶膜高效吸附分离的 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附的 DNA，从而达到快速分离纯化基因组 DNA 的目的。

## 【试剂盒组成、贮藏及有效期】

| 产品编号      | 成分组成      | 50T       | 100T     | 200T     |
|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| MDT-CBD01 | 裂解吸附液 D   | 10mL×1 瓶  | 20mL×1 瓶 | 40mL×1 瓶 |
|           | 蛋白酶 K     | 1mL×1 支   | 2mL×1 支  | 4mL×1 瓶  |
|           | RNA 清除剂   | 500μL×1 支 | 1mL×1 支  | 2mL×1 支  |
|           | RAW1 缓冲液  | 12mL×1 瓶  | 24mL×1 瓶 | 48mL×1 瓶 |
|           | 吸附柱（含收集管） | 50 支      | 100 支    | 200 支    |
|           | 洗脱液 B     | 10mL×1 瓶  | 20mL×1 瓶 | 40mL×1 瓶 |
|           | 使用说明书     | 1 份       | 1 份      | 1 份      |

**蛋白酶 K：**常温（10-30℃）运输，-20℃保存；

**RNA 清除剂：**常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

**其他试剂：**常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

## 【注意事项】使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 洗脱液使用量太少会影响提取效果。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
5. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
6. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

## 【样本要求】

新鲜的细胞标本、革兰氏阴性细菌标本、细胞保存液长期保存的细胞（革兰氏阴性细菌）。

## 【适用范围】

≤5.0×10<sup>6</sup> 个细胞；≤2.0×10<sup>9</sup> 个革兰氏阴性细菌。

## 【样本用量及 DNA 得率】

| 细胞数 (个)                | DNA 得率 (μg) |
|------------------------|-------------|
| $5.0 \times 10^6$ 上皮细胞 | 20-30       |
| 1mL 对数生长期大肠杆菌          | 15-20       |

## 【自备器械和试剂】

小型高速离心机 (最大离心力 $\geq 12,000 \times g$ )、振荡仪、金属浴、1.5mL 离心管、生理盐水和无水乙醇等。

- **RAW1 配制:** RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇, 使乙醇含量为 60%, 混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制:** 1 份水加入 4 份无水乙醇, 配制成 80%乙醇水溶液, 混匀后密封常温保存。

## 【样本处理】

### 一、细胞样本的处理

- 1. 贴壁生长细胞:** 在指数生长期, 取适量胰酶消化后的细胞加入 1.5mL 离心管中,  $12,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃上清, 保留沉淀。
- 2. 液体培养细胞:** 在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的培养细胞的悬液 (或者已计数的细胞悬液),  $12,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃上清, 保留沉淀。
- 3. 细胞保存液保存的细胞:** 取出细胞保存液保存的细胞,  $37^\circ\text{C}$  水浴中摇动至完全融化。取适量细胞转入 1.5mL 离心管中,  $12,000 \times g$  离心 1 分钟。弃上清, 保留沉淀。
4. 在沉淀中加入 200μL 生理盐水, 充分悬浮沉淀。

### 二、革兰氏阴性样本的处理

- 1. 液体培养细胞的革兰氏阴性细菌:** 在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的革兰氏阴性细菌悬液 (或者已计数的细胞悬液),  $12,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃上清, 保留沉淀。
  - 2. 固体培养的革兰氏阴性细菌:** 用接种环刮取一定量的革兰氏阴性细菌, 加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中, 充分混匀,  $12,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃上清, 保留沉淀。
  3. 在上述沉淀中加入 500μL 生理盐水, 充分悬浮沉淀。 $12,000 \times g$  离心 1 分钟。弃上清, 保留沉淀。
- 残留的培养基 (保存液) 能影响 DNA 的纯度和提取效率, 对细胞 (细菌) 进行 1 次洗涤能明显改善 DNA 纯度和提取效率。
4. 在沉淀中加入 200μL 生理盐水, 充分悬浮沉淀。

## 【标准操作步骤】

### 1A. 高纯度 DNA 提取的操作

①在上述（【样本处理】操作中获得的）生理盐水悬浮的细胞沉淀中加入 10 $\mu$ L RNA 清除剂，混匀后瞬时离心，42 $^{\circ}$ C 静置孵育 5 分钟。

②取出 1.5mL 离心管，加入 200 $\mu$ L 裂解吸附液 D 和 20 $\mu$ L 蛋白酶 K，充分混匀，瞬时离心，60 $^{\circ}$ C 静置孵育 10 分钟。

### 1B. 普通纯度 DNA 提取的操作

在上述（【样本处理】操作中获得的）生理盐水悬浮的细胞沉淀中加入 200 $\mu$ L 裂解吸附液 D、20 $\mu$ L 蛋白酶 K 和 10 $\mu$ L RNA 清除剂，充分混匀，瞬时离心，60 $^{\circ}$ C 静置孵育 10 分钟。

►有些细胞含有丰富的 RNA，RNA 残留会抑制某些下游酶实验。如果要获得无 RNA 残留的 DNA 提取物可选择“步骤 1A”；如果对 RNA 残留无特殊要求可选择“步骤 1B”。

2. 开盖，加入 200 $\mu$ L 无水乙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

►150 $\mu$ L 异丙醇代替 200 $\mu$ L 无水乙醇也可以获得较好的提取效率。

3. 闭盖 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

►转移液体时，避免液体接触吸附柱的管口。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600 $\mu$ L RAW1，闭盖 12,000 $\times$ g，离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

►加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600 $\mu$ L 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600 $\mu$ L 无水乙醇，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

7. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 3 分钟，丢弃离心管。

8. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 100 $\mu$ L 洗脱液 B 至吸附柱中心。闭盖室温静置 3 分钟，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

►洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整，但不得低于 30 $\mu$ L。

【细胞（细菌）DNA 提取（柱式法）常见问题解答】

| 常见问题          | 原因                 | 解决方案                                                                         |
|---------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 吸附柱堵塞         | 样本使用量过多            | 减少样本使用量，细胞不超过 $5\times 10^6$ 个，革兰氏阴性细菌不超过 $2.0\times 10^9$ 个。                |
| 未提取到 DNA 或产量低 | 1.样本使用量过少          | 增加样本使用量，细胞不超过 $5\times 10^6$ 个，革兰氏阴性细菌不超过 $2.0\times 10^9$ 个。                |
|               | 2.样本未及时保存或保存不当     | 样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 DNase 导致 DNA 降解。采用新鲜或正确保存的样本。                            |
|               | 3.样本裂解不充分          | 蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K。                                                          |
|               | 4.乙醇使用量过少或过多       | 按说明书准确加入无水乙醇。                                                                |
|               | 5. RAW1 中乙醇添加比例不当  | 使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。                                                    |
|               | 6. 80%乙醇水溶液配制不当    | 使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，乙醇含量达 80%。                                                 |
|               | 7.洗脱不当             | 洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 $65^{\circ}\text{C}$ 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。             |
| DNA 降解        | 1.样本未及时保存或保存不当     | 采用新鲜或正确保存的样本。                                                                |
|               | 2.样本反复冻融           | 避免样本反复冻融，分装保存。                                                               |
| 纯度低           | 1.盐离子残留            | 培养基（保存液）残留，使用生理盐水洗涤细胞（细菌）1 次；避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。            |
|               | 2.蛋白残留             | 有些样本蛋白含量较高，容易导致蛋白残留。减少样本使用量；加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；增加 1 次 RAW1 洗涤。               |
|               | 3.乙醇残留             | 最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 $12,000\times\text{g}$ 再离心 3 分钟。                               |
| RNA 残留        | 1.样本使用量过高          | 不同样本 RNA 含量相差大，减少样本使用量，细胞不超过 $5\times 10^6$ 个，革兰氏阴性细菌不超过 $2.0\times 10^9$ 个。 |
|               | 2.样本处理时未加入 RNA 清除剂 | 按说明书正确加入 RNA 清除剂。                                                            |

【说明书编制日期】 2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：[www.wuxi-medtech.com](http://www.wuxi-medtech.com)

联系电话：173 1562 0564    138 6175 7779