

核酸提取纯化试剂使用说明书

【产品名称】 磁珠法细菌基因组 DNA 纯化试剂盒。

英文名称: surbiopure bacteria DNA Kit。

【包装规格】 100 T/盒、96 T/盒。

【适用范围】 各类革兰氏阴性菌和阳性菌等。

【原理】 细菌样本经过消化液处理后与裂解结合缓冲液混合, 使得细胞破碎并将核酸释放。在裂解缓冲液中纳米磁珠颗粒通过表面修饰的功能基团能与游离的基因组DNA 特异性的结合, 形成磁珠-DNA 复合物。在外磁场力的作用下, 将磁珠-DNA 复合物转移到洗涤缓冲液中, 洗去多余的杂质。再在外磁场力的作用下转移到洗脱缓冲液中, 将 DNA 洗脱回收。

【组成成份】

货号	Sup-041601	Sup-041602	主要成分
试剂盒规格	100T	96T	
蛋白酶 K	2mL	2mL	蛋白酶 K 溶液
RNaseA	2mL	2mL	酶溶液
溶菌酶	2mL	2mL	酶溶液
Buffer RS	30mL	30mL	重悬溶液
Buffer AVL	50mL	96 孔预分装试剂板6块	强变性剂和Tris 缓冲液
Buffer WA	20mL		高盐溶液
Buffer WB×2	14mL×2		低盐溶液
Buffer DE	10mL		Tris 盐溶液
磁珠	1.5mL		CTAB磁珠溶液
研磨介质	4.0g	4.0g	酸洗玻璃珠 (0.1-0.2mm)
说明书	1	1	

注: 若购买的是Sup-041601 请在使用前在 Buffer WA 中加入30mL 的无水乙醇。在 Buffer WB 中加入56mL 的无水乙醇。无水乙醇 (分析纯) 请用户自备。

【储存注意事项】

1、蛋白酶K, 溶菌酶, RNaseA等酶溶液请于-20℃保存, 若溶液RS中加入RNase A后,

请于2-8℃保存;

2、除酶以外其他试剂于室温 (15-25℃) 保存

3、试剂盒有效期为 12 个月, 请在有效期内使用。

【适用设备与仪器】

磁性分离架、32通量全自动核酸提取仪、96通量全自动核酸提取仪。

【样本要求】

该试剂盒可以提取各类革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌, 样本量不超过 1×10^9 个细菌。

【操作方法】

一、样本前处理:

1、取1-4ml过夜培养的菌液 (视菌液浓度而定, 若是容易长的菌, 如枯草芽孢杆菌, 浓度高, 取1ml即可, 否则样品容易糊化), 室温下 $13,000 \times g$ 离心1min收集菌体, 尽量移除上清。菌液较多时, 可以通过多次离心收集菌体;

a. 革兰氏阳性菌处理: 加入20 μ L 溶菌酶溶液, 震荡混匀, 37℃ 孵育30 min~1 h (水浴锅孵育需每隔5 min颠倒混匀一次);

b. 革兰氏阴性菌处理: 如果是大肠杆菌、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、副流感杆菌、军团菌等, 可以直接进行下一步;

2、在处理好的菌体, 直接加入300 μ L RS、40 mg 铅beads、20 μ L Proteinase K (20 mg/mL), 涡旋震荡5 min, 混匀后于56℃水浴孵育10 min;

3、12,000 rpm离心10 min, 取上清进行下一步;

二、若购买的是Sup-041601请按照如下手工操作方法进行实验 (用户自备磁性分离架)

4、取第3步上清液到新的离心管里, 加入 500 μ L Buffer AVL和125 μ L的异丙醇 (用户自备), 充分振荡混匀, 将离心管放入56℃金属浴或水浴中 15min, 期间每隔 5min 上下颠倒离心管几次;

5、加 15 μ L 已混匀的磁珠到离心管中, 充分振荡, 使磁珠分散在溶液中, 室温放置 10min, 期间每隔 2-3min 上下颠倒离心管几次;

6、将离心管放入磁性分离架, 使其吸附磁珠, 磁吸时间 1min, 吸弃液体, 从磁性分离架上移开离心管;

7、加入 500 μ L Buffer WA 到离心管中, 振荡混匀 2min, 尽可能将磁珠振到完全分散, 使用磁性分离架吸附磁珠, 吸弃液体, 从磁性分离架上移走离心管;

8、加入 700μL Buffer WB 到离心管中，上下颠倒混匀 1min，确保磁珠完全分散，使用磁性分离架吸附磁珠，吸弃液体；

9、从磁性分离架上移走离心管，重复步骤7一次（注意：此步骤确保液体弃干净）

10、室温开盖干燥 5min；

11、加 80-100μL Buffer DE，振荡混匀，此时离心管壁可能会粘附磁珠，可以用移液器吸起离心管里的Buffer DE将其吹打下来，将离心管放至 60℃金属浴或水浴中 10min（注意：期间每隔 2-3min 混匀几次）；

12、使用磁性分离架吸附磁珠，吸取含有 DNA 的液体转移到干净无菌的离心管备用；

三、配套自动化仪器使用

1、样本前处理与手工提取一致。

a. 若购买的是Sup-041601，以本公司32通量全自动核酸提取仪为例，请按照如下操作方法进行。

在96孔深孔板的第1、7列中各加入 500μL Buffer AVL 和 125μL 的异丙醇（用户自备），在第2、8列中各加入 500μL Buffer WA（请确认已加无水乙醇）和 15μL 磁珠（注意：磁珠在加入前已经混合均匀），在第3、4和9、10列中各加入 700μL Buffer WB（请确认已加无水乙醇），在第6、12列中各加入100μL Buffer DE。

b. 若购买的是Sup-041602，以本公司96通量全自动核酸提取仪为例，请按照如下操作方法进行。

将室温放置的96孔试剂板颠倒3-5次，有条件的用户可以在去除塑封膜前在96孔板离心机中短暂离心，若没有离心机也可以手甩，避免挂液。小心撕去塑封膜，确认板子的方向（磁珠在2/8列），在第1、7列中各加入 125μL 的异丙醇（用户自备）。

2、在96孔板的第1、7列中各加入细菌样本处理后的上清液。

3、将96孔板放入全自动核酸提取仪的指定位置中，装上磁棒护套。

4、请按以下程序进行实验。

步骤	盘位	步骤说明	等待时间 (Min:Sec)	混合时间 (Min:Sec)	吸磁时间Sec	容积 ul	混合速度	加热设置	温度
1	1	裂解	0:00	10:00	0	900	快	开启	80℃
2	2	混合	0:00	0:00	60	200	快	关闭	
3	1	结合	0:00	10:00	60	900	快	关闭	
4	2	漂洗1	0:00	2:00	60	500	快	关闭	
5	3	漂洗2	0:00	2:00	30	700	快	关闭	
6	4	漂洗3	0:00	1:00	30	700	快	关闭	
7	6	洗脱	2:00	10:00	120	100	快	开启	70℃
8	4	干燥	0:00	0:30	0	200	快	关闭	

注：裂解温度设置成 80℃，裂解加热终止步骤 2，洗脱温度设置成 70℃，洗脱温度开始步骤 6。

5、仪器程序运行结束后，将第6、12列的Buffer DE 转移至干净的无菌离心管子中备用，如不急需使用DNA，可以将其放入-20℃冻存。

【产品性能参考数值】

纯化的 DNA OD260/OD280 比值：1.7-2.1。

【产品的局限性】

样本：样本量建议少于 1×10^9 个细菌。

结果解释：本试剂盒手工提取的效率可能会比仪器提取稍低，由于手工操作会有一些的误差造成的。

【注意事项】

1、如果室温过低，Buffer RS和Buffer AVL 可能会有少许晶体析出或变浑浊，放入 55℃ 的水浴中预热 5-10min，确认溶液澄清后再使用，对提取效果无影响。

2、上述的程序适用于本公司全自动核酸提取仪，如果用户使用其他品牌的核酸提取仪，需根据实际使用的仪器性能进行调整程序。

【基本信息】

生产企业：广州赛百纯生物科技有限公司

地址：广州市黄埔区瑞发路12号自编三栋四层自编01单位

联系方式：020-84783894

邮箱：sbctek@163.com

网址：www.surbiopure.com