

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1：从细菌培养液中提取细菌 DNA(KingFisher Flex)	5
方案 2：从细菌培养液中提取细菌 DNA (KingFisher DUO)	6
方案 3：从细菌培养液中提取细菌 DNA (KingFisher ML)	7
常见问题回答	8

版本: 2013-01

简介

MagPure Bacterial DNA KF Kit 为革兰氏阴性或阳性细菌 DNA 的提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher Duo 上使用。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern 杂交等等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳子粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计的，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。其它提取仪或移液工作站也可以使用。

MagPure Bacterial DNA KF Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。细菌经溶菌酶和蛋白酶共同作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和其它杂质，再经含乙醇洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer TE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR 等实验。

保质期

Magen Bacterial DNA KF Kit 除 MagPure Particles, Lysozyme, RNase A 和 Proteinase K 外，可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer DS 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K, Lysozyme, RNase A 和 MagPure Particles 在室温下运输，收到试剂盒后，把 Proteinase K 保存于-20℃。MagPure Particle, Lysozyme 和 RNase A 保存于 2-8℃。

组 成

MagPure Bacterial DNA KF Kit

产品编号	MD5131-00	MD5131-01	MD5131-02
纯化次数	24 次	50 次	200 次
Glass Beads (0.1~0.2mm)	6 g	20 g	80 g
MagPure Particles	0.6 ml	1.2 ml	4.6 ml
Lysozyme	50 mg	90 mg	400 mg
RNase A	5mg	5mg	20mg
Proteinase K	6 mg	12 mg	44 mg
Protease Dissolve Buffer	3 ml	5 ml	15 ml
Buffer STE Plus	15 ml	15 ml	60 ml
Buffer SDS	1.5 ml	3 ml	10 ml
Buffer DL	1.5 ml	15 ml	60 ml
Buffer BD*	3 ml	10 ml	25 ml
Buffer AW1 *	13 ml	22 ml	110 ml
Elution Buffer	5 ml	10 ml	50 ml
说明书	1	1	1

准备工作

- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。
- 溶解 Lysozyme(50mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Lysozyme 干粉中至终浓度为 50mg/ml。轻轻颠倒让溶菌酶充分溶解。分装保存于-20℃。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。
- Buffer AW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- MagPure Particles 初次使用时, 必须剧烈摇晃 1-2 分钟让磁珠充分分散。
- Buffer BD 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

方案 1. 细菌 DNA 的 KingFisher Flex 抽提

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 细菌中提取总 DNA。细菌数量可以通过分光光度计进行测量。 1OD_{600} 约为 1.5×10^9 个细菌。

1. **转移 0.5-1ml 细菌培养液或发酵液($<1.5 \times 10^9$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中。** $10,000 \times g$ 离心 1-3 分钟收集细菌，倒弃培养液。
2. **加入 180 μ l Buffer STE Plus, 30 μ l Lysozyme 和 5 μ l RNase A 至细菌沉淀团中。** 涡旋重悬细菌，室温静置 10~20 分钟。
3. **(可选)难裂解细菌：** 加入~200mg 玻璃珠至样品中，高速涡旋混匀 5~10 分钟进一步裂解细菌，静置 1 分钟，转移溶液至新的离心管中。
4. **加入 220 μ l Buffer DL 和 10 μ l Proteinase K 至细菌重悬液中。** 混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 分钟。
5. $10,000 \times g$ 离心 1 分钟收集管壁上的液滴，根据不同的机型选择合适的操作。

A. KingFisher Flex

1. 按下表把样品消化液和试剂添加到对应的板中。

板的名称	板的类型	试剂
Elution	浅孔板	Elution Buffer: 50~100 μ l
Wash 3	深孔板	80% ethanol: 600 μ l
Wash 2	深孔板	80% ethanol: 600 μ l
Wash 1	深孔板	Buffer AW1(已加乙醇): 600 μ l Comb
Sample Plate	深孔板	消化液: ~450 μ l Buffer BD: 450 μ l MagPure Particles: 20 μ l

2. 启动 KingFisher Bindit 3.3 程序，导入 MagPure_Bacterial_DNA_FL 程序。
3. 执行程序，按提示将装有样品或其它试剂的 96 孔板放到仪器的槽中。
4. 启动程序，约 30 分钟后程序执行完毕。
5. 取出 DNA 样品，用封口膜封好。

6. 把 DNA 保存于-20°C。

B. KingFisher Duo

1. 按下表将样品和试剂转移至 DW Plate 对应的孔中。

板的名称	试剂
洗脱条	Elution Buffer: 50~100µl
孔 F, G, H	空
孔 E (Wash Buffer III)	80% ethanol: 600µl
孔 D (Wash Buffer II)	80% ethanol: 600µl
孔 C (Wash Buffer 1)	Buffer AW1(已加乙醇): 600µl
孔 B	磁力外套
孔 A (样品孔)	消化液: ~450µl Buffer BD: 450µl MagPure Particles: 20µl

2. 启动 KingFisher Bindit 3.2 程序，导入 MagPure_Bacterial_DNA_Duo 程序。

3. 把装好试剂和磁力套放在仪器中，执行程序。约 30 分钟后程序执行完毕。

4. 取出 DNA 样品，把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。保存于-20°C。

C. KingFisher ML

1. 按下表将样品和试剂转移至 5 联管对应的孔中。

板的名称	试剂
第 5 个孔(洗脱孔)	Elution Buffer: 50~100µl
第 4 个孔(洗涤液 3)	80% ethanol: 600µl
第 3 个孔(洗涤液 2)	80% ethanol: 600µl
第 2 个孔(洗涤液 1)	Buffer AW1(已加乙醇): 600µl
第 1 个孔(样品孔)	消化液: ~450µl Buffer BD: 450µl MagPure Particles: 20µl

2. 启动 KingFisher Bindit 3.1 程序，导入 MagPure_Bacterial_DNA_ML 程序。把试剂条和磁力套装在仪器中。执行程序。约 30 分钟后程序执行完毕。取出 DNA 样品，把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。保存于-20°C。

附加方案:

该方案适合于从各种动物组织、血液、分泌液等液体样品中提取宿主 DNA 和寄生细菌 DNA。得到的 DNA 可直接用于细菌检测。

1. 根据需求, 选择方案 A 进行细菌 DNA 富集处理, 或按方案 B 直接提取总 DNA:

方案 A(富集提取细菌 DNA)

- a). **组织类样品:** 取 50~100mg 样品, 加入 1ml Buffer PBS 或生理盐水进行充分匀浆, 静置 1 分钟后, 取 500 μ l 上清至 1.5ml 离心管中, 加入 150 μ l Buffer DL 颠倒混匀, 静置 10 分钟后, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 第 2 步进行操作。
- b). **全血/细胞悬液:** 取 0.5~1ml 抗凝血液, 加入 2 倍体积灭菌水和 1 倍体积 Buffer DL, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- c). **分泌物或体液类等:** 取分泌物或体液, 加入 0.2 倍体积的 Buffer DL, 颠倒混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细胞和细菌; 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- d). **粘稠的分泌物:** 取 0.1~1g 痰液等, 用胰蛋白酶将痰液进行充分液化, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌, 倒弃上清液, 按第 2 步进行操作。
- e). **湿拭子样品:** 在湿拭子保存管中, 加入 0.2 倍体积的 Buffer DL, 涡旋混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细胞, 吸弃溶液, 按第 2 步进行操作。
- f). **干拭子样品:** 转移拭子至 2ml 离心管中, 加入 1ml Elution Buffer 和 0.2ml Buffer DL, 涡旋混匀, 室温放置 5 分钟, 10,000 \times g 离心 3 分钟收集细菌; , 吸弃溶液, 按第 2 步进行操作。

方案 B(总核酸提取 DNA)

- a). **组织类样品:** 取 10~20mg 组织类样品, 尽量剪碎后转移至 1.5ml 离心管中, 加入 10 μ l Proteinase K 和 230 μ l Buffer STE Plus 和 20 μ l Buffer SDS, 55 $^{\circ}$ C 消化 30~60 分钟, 加入 5 μ l RNase A, 按 3 步进操作。

- b). **全血类样品：**取 0.5~1ml 抗凝血或液体样品，加入 3 倍体积灭菌水和 0.1 倍体积的 Buffer DL，颠倒混匀，室温放置 5 分钟，10,000 × g 离心 3 分钟收集细菌和细胞。吸弃上清，余 150μl 残液和沉淀，加入 10μl Proteinase K 和 100μl Buffer STE Plus 和 20μl Buffer SDS，55℃消化 30 分钟，加入 5μl RNase A，按 3 步进操作。
 - c). **分泌物或体液类等：**取 300μl 分泌液，加入 30μl Buffer SDS 和 10μl Proteinase K，55℃消化 30 分钟，加入 5μl RNase A，按 3 步进操作。
 - d). **湿拭子样品：在湿拭子保存管中，**10,000 × g 离心 3 分钟收集细胞，吸弃溶液，余下 220ul 残液，加入 30μl Lysozyme 和 5μl RNase A 至拭子中，涡旋混匀，室温放置 20 分钟。按第 3 步进行操作。
 - e). **干拭子样品：转移拭子至 2ml 离心管中，**加入 300~350μl Buffer STE Plus、30μl Lysozyme 和 5μl RNase A，涡旋混匀，室温放置 20 分钟。按第 3 步进行操作。
2. 加入 220μl Buffer STE Plus、30μl Lysozyme 和 5μl RNase A 至细菌沉淀团中。涡旋重悬细菌，室温放置 20 分钟。
 3. 加入 200~250mg 玻璃珠至样品中，最高速度涡旋混匀 5~10 分钟进一步裂解细胞壁。静置 1 分钟后转移 250μl 上清至新的离心管中。
 4. 加入 250μl Buffer DL 至样品中，颠倒混匀，70℃水浴消化 10 分钟。
 5. 按方案 1 的机器流程进行抽提。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
DNA 产量低	
组织样品消化不彻底	动物组织最好使用玻璃匀浆器进行匀浆以提高消化效果。 延长蛋白酶 K 消化时间。
组织样品消化后离心去除不消化的物质	若组织样品经 Buffer ATL 和蛋白酶 K 消化后仍有明显的颗粒，如尾巴和皮肤等，室温离心去除杂质后转移上清再进行操作。
Buffer AV1 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
样品中 DNA 含量较低	不同的组织样品，其 DNA 含量较别很大。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率
核酸纯度不高	
RNA 污染	延长 RNase 的消化时间和增加 RNase A 用量。肝脏，脾脏等组织样品富含 RNA，需要延长 RNase 消化时间至 60 分钟。