

## 磁珠法细菌&支原体基因组DNA提取试剂盒（常规版） MagBeads Bacterial & Mycoplasma DNA Extraction Kit (Regular Version)

【目录号】BMDE-5005、BMDE-5010、BMDE-5030、BMDE-5100；

【运输条件】蛋白酶K 0~8℃运输，其它组分常温运输；

【保存条件】蛋白酶K和溶菌酶-20℃保存；其它组分室温保存；

【保质期】1年（建议保存条件下）；

### 【试剂盒组成】

Kit Component 试剂盒组成	BMDE-5005 (100T)	BMDE-5010 (100T)	BMDE-5030 (300T)	BMDE-5100 (1000T)
① BMDE-Buffer 1 细菌悬浮液	20mL	40mL	100mL	320mL
② Lysozyme Solution 溶菌酶溶液	0.8mL	1.5mL	4.5mL	15mL
③ BMDE-ML Buffer 裂解液	25mL	50mL	150mL	500mL
④ Proteinase K Solution 蛋白酶K溶液	1mL	2mL	6mL	20mL
⑤ BMDE-Magnetic Beads 磁珠悬浮液	10mL	20mL	60mL	100mL*2
⑥ BMDE-Wash Buffer 清洗液	30mL	60mL	180mL	600mL
⑦ Elute Buffer 洗脱液	5mL	10mL	30mL	100mL
⑧ DNA Settling Agent 助沉剂	4mL	8mL	24mL	80mL

### 【注意事项】

1. 磁珠悬浮液严禁反复冻融和离心，以免磁珠受到损害，使用前务必充分混匀；
2. 蛋白酶K和溶菌酶长期不使用，请置于-20℃保存，融化后4℃保存，并尽快使用；
3. 为达到最佳效果，最好使用新鲜样本，或者存放少于3天的样本，勿使用反复冻融超过3次的样本，会严重降低核酸得量及纯度；
4. 本操作指南经反复验证，使用前请仔细阅读，并按照操作指南的建议操作。

## 【产品简介】

本试剂盒适用于针对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌以及支原体进行基因组DNA抽提。试剂盒采用独特分离作用的磁珠和缓冲液系统，磁珠表面修饰有特殊化学基团，在一定条件下对DNA具有极强的特异性亲和力，而当条件改变时，磁珠可以可逆的释放DNA，从而达到快速分离纯化DNA的目的，并可最大限度的去除蛋白质及其它杂质，从而保证提取基因组的纯度。

采用本试剂盒纯化所获得基因组DNA纯度高， $OD_{A260/280}$ 在1.70~1.90之间，可用于各种下游分子生物学实验，如酶切、PCR、qPCR、文库构建等。

## 【试剂盒说明】

样本类型	样本量	菌体或支原体数量	核酸得量
细菌培养液	1~5mL	1.0~5.0E+09	1~20μg
支原体培养液	1~5mL	1.0~5.0E+09	1~5μg

注：当 $OD_{600}=1$ 时，认为1mL菌液（支原体）培养液中含有 $1.0E+09$ 个菌体（支原体）。

## 【自备仪器、耗材和试剂】

多功能动态金属浴（英芮诚ETP-MH96型，若无，可用静态金属浴或水浴锅代替）、真空干燥箱、96孔方孔圆底板及配套磁棒套（英芮诚96孔板套装，p/n: XHP-0009）、2.0mL离心管、英芮诚16孔磁力架（p/n: CQT-0001）或者多功能磁力架（p/n: CQT-0011）、涡旋混合仪、80%乙醇、异丙醇、RNase A（100mg/mL，分散液：10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH值8.0）。

## 【仪器自动版操作步骤】

本操作以英芮诚ETP-300型自动核酸提取仪为例，同步可完成32个样本的提取工作。

### 1. 96孔板加液

参照下表向96孔板各样本孔位中分别加入对应试剂：

样本位	1、7	2、8	3、9	4、10	5、11	6、12
试剂	磁珠悬浮液 200μL	异丙醇 300μL 助沉剂 80μL	清洗液 1 600μL	80%乙醇 600μL	80%乙醇 600μL	洗脱液 100μL

注：1) 每次吸取磁珠悬浮液前尽量摇晃均匀；2) 为提高效率建议使用排枪；3) 试剂加板完毕请尽快使用，防止醇挥发导致结果波动。

### 2. 样本收集

**革兰氏阴性菌：**取1~5mL菌液，12,000rpm离心2min，除尽上清液，收集沉淀。

**革兰氏阳性菌：**取1~5mL菌液，12,000rpm离心2min，除尽上清液；加入100μL细菌悬浮液以及15μL溶菌酶溶液，将EP管置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、37℃加热温浴45min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上37℃温浴60min，需期间每隔10min混匀一次）。

**支原体：**取支原体培养液1~5mL，13000rpm离心10 min，除尽上清液，收集沉淀。

### 3. 样本裂解

**细菌：**向菌体沉淀中加入450μL裂解液和20μL蛋白酶K溶液，将菌体悬浮均匀至没有明显颗粒状。置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、58℃加热裂解15min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上58℃加热裂解15min，需期间每隔5min混匀一次）。

**支原体：**向支原体沉淀中加入500μL裂解液和20μL蛋白酶K溶液，将支原体沉淀悬浮均匀至没有明显颗粒状。置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、58℃加热裂解25min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上58℃加热裂解30min，需期间每隔5-10min混匀一次）。

*注：支原体易贴壁，离心前可用移液枪吹打均匀；2）如需去除 RNA 可加入 5μL RNase A。*

### 4. 上机提取

将裂解完毕裂解液转移至96孔板的2号（或8号）位孔中，然后将96孔板放入ETP-300型核酸提取仪中，插入磁棒套，打开仪器操作软件，调用“细菌&支原体基因组DNA提取实验方法”程序，单击“运行”。

“细菌&支原体基因组 DNA 提取实验方法”程序各参数设置如下，如仪器上程序参数与说明书不一致，请以说明书为准：

步骤编号	孔位	运行类型	振荡时间(s)	分离时间(s)	挥发时间(s)	振荡幅度	振荡强度	一组温度(°C)	二组温度(°C)	三组温度(°C)	四组温度(°C)
1	1	磁珠转移	2	5	0	2	强	0	0	0	0
2	2	DNA 结合	480	5	0	4	中	0	0	0	0
3	3	清洗 1	240	5	0	5	中	0	0	0	0
4	4	清洗 2	180	5	0	5	中	0	0	0	0
5	5	清洗 2	120	5	290	5	中	0	0	0	0
6	6	洗脱	360	20	0	2	中	60	60	60	60
7	3	弃磁珠	5	0	0	5	强	0	0	0	0

### 5. 核酸转移

程序运行完毕，取下96孔板，将洗脱液转移至干净的离心管或者PCR板中即得提取的基因组DNA。

#### 【手动版操作步骤】

#### 1. 样本收集

**革兰氏阴性菌：**取1~5mL菌液，12,000rpm离心2min，除尽上清液，收集沉淀。

**革兰氏阳性菌：**取1~5mL菌液，12,000rpm离心2min，除尽上清液；加入100μL细菌悬浮液以及15μL溶菌酶溶液，将EP管置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、37℃加热温浴45min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上37℃温浴60min，需期间每隔10min混匀一次）。

**支原体：**取支原体培养液1~5mL，13,000rpm离心10 min，除尽上清液，收集沉淀。

## 2. 样本裂解

**细菌：**向菌体沉淀中加入500 $\mu$ L裂解液和20 $\mu$ L蛋白酶K溶液，将菌体悬浮均匀至没有明显颗粒状。置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、58 $^{\circ}$ C加热裂解15min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上58 $^{\circ}$ C加热裂解15min，需期间每隔5min混匀一次）。

**支原体：**向支原体沉淀中加入500 $\mu$ L裂解液和20 $\mu$ L蛋白酶K溶液，将支原体沉淀悬浮均匀至没有明显颗粒状。置于58 $^{\circ}$ C水浴锅中裂解25min，期间混匀2~3次。

*注：支原体易贴壁，离心前可用移液枪吹打均匀；2）若需去除RNA可加入5 $\mu$ L RNase A。*

## 3. 核酸结合

向离心管中依次加入300 $\mu$ L异丙醇、200 $\mu$ L磁珠悬浮液和80 $\mu$ L助沉剂，盖上离心管盖，上下剧烈摇晃3~5次充分混匀内容物，然后置于涡旋混合仪上1200rpm涡旋振荡5min。

## 4. 磁性分离

将离心管置于磁力架上，静置30sec至磁珠吸附完全。若离心管内盖中有残留磁珠，可保持离心管在磁力架上，颠倒2~3次至磁珠全部吸附，用移液枪小心吸弃上清液。

## 5. 清洗 1

向上述离心管中加入600 $\mu$ L清洗液，用移液枪吹散磁珠，置于涡旋混合仪上1200rpm振荡1min。参考步骤4进行磁性分离。

## 6. 清洗 2

使用600 $\mu$ L 80%乙醇参考步骤5操作2次。

## 7. 除醇

将弃尽上清液后的离心管放置在磁力架上，连同磁力架一起放入事先准备好的45 $^{\circ}$ C真空干燥箱中，真空干燥10min，确保除醇完全以免残留乙醇抑制下游反应。

*注：若无真空干燥箱，亦可在通风橱通风或电风扇直吹状态下静置约10min，具体时间可根据气温变化进行调整，干燥至磁珠颜色变浅，无明显乙醇气味即可，过度干燥会严重影响DNA产物的洗脱效率。清洗液2清洗结束后，用无水乙醇漂洗一遍，可以提高除醇的效率。*

## 8. 洗脱

向离心管中加入50~100 $\mu$ L洗脱液，高速涡旋振荡1min（或移液枪反复吹打10次），然后将EP管置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、60 $^{\circ}$ C加热洗脱6min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上60 $^{\circ}$ C加热洗脱8min，需期间每隔3min高速涡旋振荡一次）。

## 9. 核酸转移

洗脱完毕，将离心管置于磁力架上，静置30sec，将上清液转移至另一干净离心管中，即得提取的基因组DNA。

*版权声明：© 英芮诚生化科技(上海)有限公司保留本使用指南所有权利。版本：V201812.141*

**英芮诚生化科技（上海）有限公司**

地址：上海市杨浦区国权北路1688号湾谷科技园A8座303室

电话：021-55809378

网址：www.bio-enriching.com

电子邮件：marketing@bio-enriching.com