

M5 SuperFast Universal Genomic DNA Kit

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 SuperFast Universal Genomic DNA Kit	96T	MF289-01

【储存条件】 室温储存 12 个月。

【产品简介】

本产品基于磁珠分离纯化方式，适合从血液、干血斑、组织和细菌等样品中分离纯化高质量基因组 DNA，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。该试剂盒可整合磁棒法或移液法自动核酸提取仪进行高通量提取实验，也可使用磁力分离架进行手工操作。Mei5Mag 纯化系统以超顺磁性的纳米磁性粒子为基质，这种磁性粒子在高浓度离液剂的条件下可通过氢键和静电特异的吸附核酸，而蛋白质或其它非特异吸附的少量杂质经洗涤被去除，最后用低盐缓冲液或 RNase Free ddH₂O 洗脱核酸。纯化的核酸可适用于各种常规操作，包括 PCR、荧光定量 PCR 和病毒检测等各种下游实验。

【自备试剂】 无水乙醇

Enzymatic Lysis Buffer（提取革兰氏阳性菌基因组 DNA 时须准备）。Enzymatic Lysis Buffer 配方：20 mM Tris，pH 8.0；2 mM Na₂-EDTA；1.2% Triton X-100；终浓度为 20mg/ml 的 Lysozyme（溶菌酶）。

【产品组份】

	96T	
Buffer GTL	25 ml	
Buffer GL	25 ml	
Buffer GW1 (concentrate)	26 ml	第一次使用请加入 34ml 的无水乙醇
Buffer GW2 (concentrate)	30 ml	第一次使用请加入 90ml 的无水乙醇
Buffer GE	20 ml	
Proteinase K	1 ml ×2	
Mei5Mag Particles GF	1 ml ×2	

【实验前准备及重要注意事项】

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取 DNA 片段较小且提取量下降。
2. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。
3. 第一次使用前应按试剂瓶标签的说明在 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查 Buffer GTL 和 Buffer GL 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将 Buffer GL 和 Buffer GTL 于 56°C 水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对 RNA 污染比较敏感，可以在加入 Buffer GL 前加入 4μl DNase-Free 的 RNase A (100mg/ml)，RNase A 本试剂盒并未提供，可单独订购。

【操作步骤】

一、血液及细胞样本基因组提取

1. 材料处理
 - a) 如果提取材料为哺乳动物抗凝血液（无核红细胞），可直接向 50–200 μ l 新鲜或冷冻的抗凝血液样品中加入 Buffer GTL 补足至 200 μ l。
 - b) 如果提取材料为禽类，鸟类，两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，取 5–10 μ l 新鲜或冷冻的抗凝血液样品，加入 Buffer GTL 补足至 200 μ l。
 - c) 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5×10^6 个细胞），2000 rpm (400 \times g) 离心 5 分钟，弃尽上清，加 200 μ l GTL，振荡至样品彻底悬浮。
注意：如需去除 RNA，可在上述步骤完成后，加入 4 μ l 浓度为 100mg/ml 的 RNase A 溶液，涡旋 15 秒，室温放置 2 分钟。
2. 加入 20 μ l Proteinase K 溶液,混匀。
3. 加入 200 μ l Buffer GL，涡旋振荡充分混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入 200 μ l 无水乙醇，涡旋振荡充分混匀，短暂离心，加入 20 μ l Mei5Mag Particles GF 涡旋 30 秒。
注意：1) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。
2) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织在加入 BufferGL 和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。
5. 将离心管置于磁力架上静置 1min，待磁珠完全吸附后，吸去液体。
6. 将离心管从磁力架上取下，加入 500 μ l Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），涡旋 30 秒，待磁珠完全吸附后，吸去液体。
7. 将离心管从磁力架上取下，加入 500 μ l Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），涡旋 30 秒，待磁珠完全吸附后，吸去液体。
注意：如需进一步提高 DNA 纯度，可重复步骤 7。
8. 将离心管置于磁力架上，开盖室温放置 5min。
（注意：乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等），所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥过度，以免 DNA 难以洗脱）
9. 将离心管从磁力架上取下，加入 50–200 μ l Buffer GE 或灭菌水，充分震荡 2min，将离心管置于磁力架上静置 1min，待磁珠完全吸附后，小心将溶液转移至新的离心管中，并于适当条件保存。
注意：1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0–8.5（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。
2) Buffer GE 在 65–70 $^{\circ}$ C 水浴预热，洗脱之前室温孵育 5 分钟可以增加产量；用另外的 50–200 μ l BufferGE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
3) 若洗脱体积小于 200 μ l，可以增加 DNA 的终浓度，但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μ g，推荐用 50 μ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。
4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用 Buffer GE 洗脱并于–20 $^{\circ}$ C 保存。

二、动物组织基因组提取

1. 材料处理
如果提取材料为动物组织，取 25 mg（脾组织用量应少于 10 mg）；如果材料为鼠尾，取一段长度为 0.4–0.6 cm 的大鼠鼠尾或两段长度为 0.4–0.6 cm 的小鼠鼠尾。
 - a. 样本进行液氮研磨或切成小块后置于 1.5 ml 离心管中，加入 180 μ l Buffer GTL，将不同样品做好标记。
 - b. 若使用匀浆器处理样本，匀浆前向样本中加入不超过 80 μ l Buffer GTL，匀浆后加入 100 μ l Buffer GTL。
注意：1) 确保各组织的量不要超出推荐范围。
2) 组织样本在加入 Buffer GTL 之前用液氮研磨或加入 Buffer GTL 用匀浆器匀浆处理，可以增加裂解效率。

2. 加入 20 μ l Proteinase K, 涡旋震荡使样品彻底混匀。56°C 水浴, 直至组织完全裂解, 孵育过程中可每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样品分散。
注意: 1) 不同组织消化时间不同, 通常 1-3 小时即可完成, 鼠尾需要消化 6-8 小时, 必要时过夜消化, 不会影响后续操作。
2) 如果孵育和涡旋震荡后仍然有胶状物质, 延长 56°C 孵育时间或再加入 20 μ l Proteinase K 消化。
3) 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 μ l 的浓度为 100mg/ml 的 RNase A 溶液, 涡旋 15 秒, 室温放置 5-10 分钟。
3. 加入 200 μ l Buffer GL, 涡旋震荡充分混匀, 70°C 水浴 10 分钟。短暂离心后加入 200 μ l 无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。加入 20 μ l Mei5Mag Particles GF 涡旋 30 秒。
注意: 1) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。
2) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。一些组织 (如脾, 肺) 在加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能形成溶胶状产物, 此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。
4. 将离心管置于磁力架上静置 1min, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
5. 将离心管从磁力架上取下, 加入 500 μ l Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 涡旋 30 秒, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
6. 将离心管从磁力架上取下, 加入 500 μ l Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 涡旋 30 秒, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
注意: 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复步骤 6。
7. 将离心管置于磁力架上, 开盖室温放置 5min。
(注意: 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等), 所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥过度, 以免 DNA 难以洗脱)
8. 将离心管从磁力架上取下, 加入 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水, 充分震荡 2min, 将离心管置于磁力架上静置 1min, 待磁珠完全吸附后, 小心将溶液转移至新的离心管中, 并于适当条件保存。
注意: 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。
2) Buffer GE 在 65-70°C 水浴预热, 洗脱之前室温孵育 5 分钟可以增加产量; 用另外的 50-200 μ l BufferGE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
3) 若洗脱体积小于 200 μ l, 可以增加 DNA 的终浓度, 但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μ g, 推荐用 50 μ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。
4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响, 如需长期保存, 推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20°C 保存。

三、细菌基因组提取

1. 细菌样本预处理
 - 1a. 革兰氏阴性菌
 - (1) 取细菌培养物 1-5 ml (10^6 - 10^8 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管 (自备) 中, 12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。
 - (2) 向沉淀中加入 180 μ l Buffer GTL, 振荡使菌体重悬。
 - (3) 加入 20 μ l Proteinase K, 涡旋混匀。
 - (4) 加入 200 μ l Buffer GL, 涡旋震荡混匀。56°C 孵育, 直至菌体完全裂解, 孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。
注意: 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。

1b. 革兰氏阳性菌

- (1) 取细菌培养物 1-5 ml (10^6 - 10^8 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管 (自备) 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。
 - (2) 加入 180 μ l Enzymatic Lysis Buffer (自备) 使菌体重悬。
 - (3) 37°C 孵育 30 分钟。
 - (4) 加入 20 μ l Proteinase K 涡旋震荡, 充分混匀。加入 200 μ l Buffer GL, 涡旋震荡混匀。56°C 孵育 30 分钟。
注意: 1) 如果需要, 95°C 孵育 15 分钟可以使病原体失活, 但是 95°C 孵育会造成一些 DNA 的降解。
- 2) 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 μ l 浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。
2. 加入 200 μ l 无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀加入 20 μ l Mei5Mag Particles GF 涡旋 30 秒。
注意: 加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。
 3. 将离心管置于磁力架上静置 1min, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
 4. 将离心管从磁力架上取下, 加入 500 μ l Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 涡旋 30 秒, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
 5. 将离心管从磁力架上取下, 加入 500 μ l Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 涡旋 30 秒, 待磁珠完全吸附后, 吸去液体。
注意: 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复步骤 5。
 6. 将离心管置于磁力架上, 开盖室温放置 5min。
(注意: 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等), 所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥过度, 以免 DNA 难以洗脱)
 7. 将离心管从磁力架上取下, 加入 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水, 充分震荡 2min, 将离心管置于磁力架上静置 1min, 待磁珠完全吸附后, 小心将溶液转移至新的离心管中, 并于适当条件保存。
注意: 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。
2) Buffer GE 在 65-70°C 水浴预热, 洗脱之前室温孵育 5 分钟可以增加产量; 用另外的 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
3) 若洗脱体积小于 200 μ l, 可以增加 DNA 的终浓度, 但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μ g, 推荐用 50 μ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。
4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响, 如需长期保存, 推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20°C 保存。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。