

## 目 录

简 介	2
原 理	2
保 质 期	2
试 剂 盒 组 成	3
准 备 工 作	3
方 案 1: 从 小 体 积 痰 液 中 提 取 结 核 杆 菌 DNA	4
方 案 2: 从 大 体 积 痰 液 中 提 取 结 核 杆 菌 DNA	5
方 案 3: 从 呼 吸 道 灌 洗 液 中 提 取 结 核 杆 菌 DNA	6
方 案 4: 从 组 织 或 血 液 样 品 中 提 取 结 核 杆 菌 DNA	7
常 见 问 题 回 答	8

版本: 2024-01

## 简介

HiPure MycoBacterial DNA Kit 为结核杆菌的 DNA 提取提供了可靠的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，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。试剂盒适合于从各种生物样品，如痰液、组织、呼吸道灌洗液、血液等样品高效提取结核杆菌的 DNA。

## 原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，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。吸附了核酸的滤膜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，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure MycoBacterial DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。细菌经溶菌酶消化去除细胞壁，经高温处理进一步裂解结核杆菌，然后在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 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、酶切、Southern blot 等实验。

## 保质期

HiPure MycoBacterial DNA Kit 除 Proteinase K 和 Lysozyme 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℃。Proteinase K, Lysozyme 干粉室温运输，收到试剂盒后请保存于 2-8℃或-20℃。

## 组 成

### HiPure MycoBacterial DNA Kit

产品编号	D3178-01	D3178-02	D3178-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ATL	5 ml	20 ml	60 ml
Buffer GXP	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer AE	1 ml	10 ml	60 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	110 mg
Proteinase Dissolve Buffer	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

### 需要准备材料和工具

- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Proteinase Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。颠倒混匀，保存于-20℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，于室温保存
- 结核杆菌具有很强的感染能力，请注意安全防护
- 振荡金属浴或振荡水浴(37℃, 56℃和 95℃)
- 配制 NaOH-NALC 溶液: 2% NaOH, 0.5% N-acetyl-L-cysteine

## 方案 1. 从小体积痰液样品中提取结核杆菌 DNA

1. 转移 100~500 $\mu$ l 痰液样品至 1.5ml 离心管中。
2. 加入等倍体积的 NaOH-NALC Buffer (4% NaOH, 1% NALC) 至样品中, 涡旋混匀, 室温振荡混匀 20 分钟液化痰液。
3. 13,000  $\times$  g 离心 5 分钟, 小心吸弃上清液。
4. 加入 200 $\mu$ l Buffer ATL 和 10 $\mu$ l Proteinase K 至样品中, 涡旋重悬样品。
5. 56 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟, 95 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。
6. 加入 500 $\mu$ l Buffer GXP 至裂解液中, 涡旋混匀 10 秒。
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 6 步获得的混合液转移至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
Buffer GW2 使用前, 须用无水乙醇稀释, 按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。再加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
10. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 15~50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子膜中央, 静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 方案 2. 从大体积痰液样品中提取结核杆菌 DNA

1. 转移 1~5ml 痰液样品至 15ml 离心管中，于 85℃ 温育 30 分钟灭活样品。加入等倍体积的 NaOHNALC Buffer (4% NaOH, 1% NALC) 至样品中。涡旋混匀，室温下振荡混匀 20 分钟液化痰液。
2. 4000rpm(~2,000 × g) 离心 15 分钟，小心吸弃所有的上清液。
3. 加入 300µl Buffer ATL 和 10µl Proteinase K 至样品中，涡旋重悬样品。
4. 56℃ 温育 20 分钟。95℃ 温育 20 分钟。
5. 加入 450µl Buffer GXP 至样品中，涡旋混匀 10 秒。

若混合液仍有许多不溶解的物质，涡旋混匀后，10,000 × g 离心 2 分钟去除不溶解的物质，按第六步操作时，把上清液转移至 gDNA Micro Column 中。

7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 6 步获得的混合液转移至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer GW2 使用前，须用无水乙醇稀释，按瓶子标签指示进行稀释。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 3 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 15~50µl Buffer AE 至柱子膜中央，静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需保存于 -20℃。

### 方案 3. 从呼吸道灌洗液中提取结核杆菌 DNA

1. 转移 1ml 呼吸道灌洗液(Bronchialveolar Lavage Sample)至 1.5ml 离心管中。
2. 10,000 x g 离心 15 分钟，小心吸弃所有的上清液。
3. **加入 200µl Buffer ATL 和 10µl Proteinase K 至样品中**，涡旋重悬样品。
4. 56°C 温育 20 分钟。95°C 温育 20 分钟。
5. **加入 500µl Buffer GXP 至样品中**，涡旋混匀 20 秒。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 步获得的混合液转移至柱子中。10,000 x g 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。10,000 x g 离心 1 分钟。  
  
Buffer GW2 使用前，须用无水乙醇稀释，按瓶子标签指示进行稀释。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**再加入 600µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。10,000 x g 离心 1 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 x g 离心 3 分钟。
10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50µl Buffer AE 至柱子膜中央**，静置 2 分钟。10,000 x g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需保存于-20°C。

## 方案 4. 从组织或全血样品中提取结核杆菌 DNA

1. 转移 10~15mg 组织样品或~100 $\mu$ l 全血或分泌液样品至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 200 $\mu$ l Buffer ATL 和 10 $\mu$ l Proteinase K 至样品中，涡旋重悬样品。
3. 56 $^{\circ}$ C 温育 30~60 分钟。95 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。
4. 加入 500 $\mu$ l Buffer GXP 至样品中，涡旋混匀 30 秒。
6. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。把第 5 步获得的混合液转移至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
Buffer GW2 使用前，须用无水乙醇稀释，按瓶子标签指示进行稀释。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 15~50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子膜中央，静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 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	原因及解决方法
<b>柱子堵塞</b>	
需要离心去除不消化物质	消化液上柱前，10,000 × g 离心 3 分钟去除杂质。
样品用量太多	减少样品用量。
<b>DNA 产量低</b>	
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于 -20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
Buffer GW2 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。