

《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》（离心柱法）说明书（版本 20201218）**【本说明书会不定期更新，每次收到新的产品时，请到本公司网站重新下载最新版本！】****货号**

MG015

包装规格

50 次/盒

储存条件

该产品常温运输，室温保存（收货后，其中的 Proteinase K 放-20℃保存）。该条件下，至少 3 年内有效。Proteinase K 溶液可以在室温保存 2-3 个月，长期保存需要放-20℃。

产品简介

《支原体基因组 DNA 提取试剂盒》（离心柱法）（Mycoplasma Genomic DNA Extraction Kit with Columns）的操作方法和试剂配方已经针对支原体的特点做了优化，专门用于从体外培养的细胞、细胞上清、血清、血浆、全血、生物制品等样品中提取支原体基因组 DNA。提取的支原体基因组 DNA 可用于《一步法恒温支原体检测试剂盒》、《PCR 法支原体检测试剂盒》和《探针法支原体检测试剂盒》。

支原体基因组 DNA 的提取有两个作用：（1）可以去除所有可能抑制 PCR 扩增的成分或者干扰《一步法恒温支原体检测试剂盒》显色的成分，保证后续 PCR 扩增的正常进行或者《一步法恒温支原体检测试剂盒》的显色不被干扰；（2）具有浓缩支原体 DNA 的作用，可以提高相对检测灵敏度 10-100 倍。

产品组份（50 次）

蛋白酶 K 溶液: Proteinase K (20 mg/mL)	1 mL
溶液 GR: Buffer GR	15 mL
溶液 GL: Buffer GL	15 mL
清洗液 GW1: Buffer GW1(Concentrate)	13 mL
清洗液 GW2: Buffer GW2(Concentrate)	15 mL
洗脱液 EB: Elution Buffer EB	15 mL
吸附柱: Spin Columns DM	50 个
收集管: Collection Tube	50 个

- 需自备的试剂和耗材：（1）无水乙醇，约 65 mL；（2）1.5 mL 离心管

操作步骤**1. 实验前准备及重要注意事项**

- 1) Buffer GW1 和 Buffer GW2 的配制：第一次使用前，应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇，并在试剂瓶标签中做好标记。
- 2) 使用前请检查 Buffer GL 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将 Buffer GL 于 56℃ 水浴孵育重新溶解。
2. 样品处理：本试剂盒优选体外培养的细胞上清（贴壁细胞直接取细胞培养上清、悬浮培养细胞取低速离心后的离心上清）、血清、血浆、溶液型生物制品作为提取支原体基因组 DNA 的样品。如果是粉末型样品，需用水溶解后，再进行后续操作。

- 注 1: 体外培养的贴壁细胞培养上清或悬浮细胞, 经 1200 rpm (约 150 g) 低速离心 5 分钟后 (切记: 此步骤离心力不能太大, 否则支原体会被离心去除了!), 取离心后上清进行检测。
 - 注 2: 如果初始样品是加了抗凝剂的全血, 经 1200 rpm (约 150 g) 低速离心 10 分钟后 (切记: 此步骤离心力不能太大, 否则支原体会被离心去除了!), 取上层血浆进行检测。
 - 注 3: 如果初始样品是未加抗凝剂的全血, 待血液凝固后, 取血清进行检测。
3. 取上述细胞上清、血清、血浆、生物制品等样品 200 μ L, 用移液枪吹吸均匀后, 进行后续操作。
- 注 1: 当样品量小于 200 μ L 时, 加入 Buffer GR 补足至 200 μ L, 再进行下一步实验。
 - 注 2: 如果预期待测样品支原体含量较少 (比如长期低温保存的血清、血浆、胰酶、生物制品等), 可以取上述样品 1 mL, 加入 1.5 mL 离心管内, 13000 rpm (约 16000 g) 高速离心 5 分钟。吸走离心后的上清 800 μ L, 剩余 200 μ L 用移液枪吹吸均匀后, 进行后续操作。此步骤起浓缩支原体的作用, 从而提高支原体检测的相对灵敏度。如果需要, 上述样品的体积可以进一步放大, 经过多次高速离心后, 剩余 200 μ L 用于后续操作 (比如, 如果初始体积是 5 mL, 经 5 次高速离心, 取剩余的 200 μ L 进行后续操作, 最终用 50 μ L 洗脱液进行洗脱, 则支原体 DNA 大约浓缩了 100 倍, 支原体检测的相对灵敏度也大约提高了 100 倍。)
4. 向以上溶液中加入 20 μ L Proteinase K (20 mg/mL) 溶液, 混匀。
5. 加入 200 μ L Buffer GL (如果室温较低, 使用前请检查 Buffer GL 是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀, 请将 Buffer GL 于 56°C 水浴孵育重新溶解), 用吸头充分吹吸均匀或用 Vortex 充分震荡。
- 注意: 不要将 Proteinase K 和 Buffer GL 进行预混, 否则 Proteinase K 可能失活。
6. 将离心管放置 56°C 水浴, 孵育 15 分钟。
- 注意: 此步骤不能省略!
7. 加入 2 μ L 支原体 qPCR 内参质粒 mycolC2 (注意: 内参质粒 mycolC2 请吹吸均匀后, 再加入。内参质粒 mycolC2 只在本公司《探针法支原体检测试剂盒》内含有, 如果使用其他支原体检测方法, 本步骤可以跳过!)。
- 注 1: 此步骤只有使用本公司《探针法支原体检测试剂盒》时, 需要加入支原体 qPCR 内参质粒 mycolC2。
 - 注 2: 加入的内参质粒 mycolC2 用于监控支原体 DNA 的提取和后续支原体 qPCR 的扩增是否有效。
8. 加入 200 μ L 无水乙醇, 上下颠倒混匀数次。
- 注意: 此处不能高速离心! 如果需要 (一般不需要离心), 只能 1000 rpm (约 100 g) 低速短暂离心 (20 Sec), 使管壁和盖盖上的液体集中到管底。
9. 用 1 mL 吸头将所得溶液全部 (含管壁和盖子上溶液) 加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中。12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GW1 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 盖上盖子, 将吸附柱快速颠倒一次 (目的: 清洗管壁和盖子中的杂质), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
11. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 盖上盖子, 将吸附柱快速颠倒一次 (目的: 清洗管壁和盖子中的杂质), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
12. 再次清洗: 向吸附柱中加入 600 μ L Buffer GW2 (使用前检查是否加入无水乙醇!), 盖上盖子, 将吸

附柱快速颠倒一次 (目的: 清洗管壁和盖子中的杂质), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

13. 继续 12,000 rpm 离心 2 分钟。离心后, 在亮光下, 仔细检查吸附柱内部吸附膜上方的塑料垫圈四周是否有液体残留。如果发现吸附柱内部塑料垫圈四周有液体残留, 可以将吸附柱放回收集管内, 将有液体残留的一侧放在离心力内侧, 继续 12,000 rpm 离心 1 分钟。

14. 离心后, 经仔细检查, 如果确认吸附柱内部塑料垫圈四周没有液体残留, 则可以丢弃收集管, 将吸附柱置于一个新的 1.5 mL 离心管 (自备) 中, 打开吸附柱盖子, 置于 50-65°C 的烘箱内放置至少 15 分钟, 以让吸附膜中的乙醇彻底挥发干净 (请务必放在 50-65°C 的烘箱内放置! 如果室温放置, 不仅时间需要延长, 还不排除有些样品由于乙醇挥发不干净, 影响后续 PCR 扩增效率, 甚至彻底失败)。

- 注意: 打开吸附柱盖子, 将吸附柱放在 50-65°C 的烘箱内至少 15 分钟, 此步骤非常关键! 如果没有烘箱, 强烈建议购买一个。这一步的目的是将吸附膜中残余的乙醇彻底去除, 乙醇的残留会严重影响后续的酶促反应 (如: 酶切、PCR 扩增等), 甚至可能导致后续的 PCR 彻底失败。

15. 向吸附柱的中间部位悬空加入 50 μ L Elution Buffer EB, 室温放置 3 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20°C 保存。

- 注 1: 本公司的 Elution Buffer EB 是经过优化的洗脱液, 该洗脱液与本公司的所有基于核酸扩增技术的支原体检测试剂盒完全兼容 (包括: 一步法恒温支原体检测试剂盒, PCR 法支原体检测试剂盒和探针法支原体检测试剂盒)。如果是其他公司 DNA 提取试剂盒的洗脱液, 当反应体系中样品 DNA 量加大后 (比如反应体系中 DNA 加入量由 2 μ L 变为 20 μ L 时) 有可能会影响到核酸的扩增效率。

- 注 2: 如果样品的初始体积分别是 200 μ L、1 mL 或 5 mL, 经最后 50 μ L 洗脱, 则支原体 DNA 分别大约浓缩了 4 倍、20 倍或 100 倍, 支原体检测的相对灵敏度也大约提高了 4 倍、20 倍或 100 倍。