

## MagPure Environmental DNA Kits

### 磁珠法环境类 DNA 提取试剂盒

本产品是专门为环境类样品的 DNA 提取而设计的。试剂盒采用磁珠法纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种土壤，粪便、食品、残渣，底泥等样品中提取高产量高纯度的总 DNA。腐殖酸吸附剂可高效地吸附土壤样品中的腐殖酸和其它抑制因子，纯化的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、酶切等实验。样品在裂解液和蛋白酶的作用下裂解消化，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。

**产品组成：** 瓶装试剂 (Elution Buffer: 10mM Tris,pH8.5)

| 产品编号              | D6357-01 | D6357-02 | D6357-03 |
|-------------------|----------|----------|----------|
| 纯化次数              | 48 次     | 96 次     | 480 次    |
| 2ml 匀浆管 B         | 48 次     | 96 次     | 480 次    |
| MagPure Particles | 2.5 ml   | 3.5 ml   | 17 ml    |
| Buffer STL        | 60 ml    | 100 ml   | 500 ml   |
| Buffer SL         | 15 ml    | 25 ml    | 110 ml   |
| Buffer GDP        | 70 ml    | 120 ml   | 550 ml   |
| Buffer BW1 *      | 13 ml    | 26 ml    | 110 ml   |
| Elution Buffer    | 10 ml    | 15 ml    | 60 ml    |

### 保存条件

本产品室温运输和保存时，有效期 18 个月。

**产品组份：** 预分装试剂, 32 通道 (Elution Buffer: 10mM Tris,pH8.5)

| 货号         | 预分装试剂和装量  | D6357-TL-06, 96 人份 |
|------------|---|--------------------|
| 2ml 匀浆管 B  |   | 96 个               |
| Buffer STL |   | 100 ml             |
| Buffer SL  |   | 30 ml              |
| 8联磁力外套     |   | 12个                |
| 预装试剂板      | 第1/7排孔: 500 $\mu$ l Buffer GDP                                  | 6 块                |
|            | 第2/8排孔: 500 $\mu$ l Buffer GDP                                  |                    |
|            | 第3/9排孔: 500 $\mu$ l Buffer BW1                                  |                    |
|            | 第4/10排孔: 500 $\mu$ l Buffer GW2<br>30 $\mu$ l MagPure Particles |                    |
|            | 第5/11排孔: 500 $\mu$ l Buffer GW2                                 |                    |
|            | 第6/12排孔: 100 $\mu$ l Elution Buffer                             |                    |

**产品组份：** 预分装试剂, 96 通道 (Elution Buffer: 10mM Tris,pH8.5)

| 货号           | 预分装试剂和装量                               | D6357-F-96, 96 人份 |
|--------------|--|-------------------|
| 2ml 匀浆管 B    |  | 96 个              |
| Buffer STL   |  | 100 ml            |
| Buffer SL    |  | 30 ml             |
| 96磁套         |  | 1 个               |
| 样品板 1        | 500 $\mu$ l Buffer GDP                 | 1 块               |
| 清洗板 1(样品板 2) | 500 $\mu$ l Buffer GDP                 | 1 块               |
| 清洗板 2        | 500 $\mu$ l Buffer BW1                 | 1 块               |
| 清洗板 3        | 500 $\mu$ l Buffer GW2, 30 $\mu$ l磁珠MP | 1 块               |
| 清洗板 4        | 500 $\mu$ l Buffer GW2                 | 1 块               |
| 洗脱板          | 100 $\mu$ l Elution Buffer             | 1 块               |

### 保存条件

本产品室温运输和保存时, 有效期 18 个月。

## 准备工作

- 人类粪便样本可能含有未消化的食物物质（例如，作物或水果壳，未消化的种子），这些颗粒最好不要转移。动物粪便样本，降低样本量可能会得到更好的结果。非常干燥的粪便样品，如兔或小鼠粪便，可能会吸收裂解液，导致离心后样品体积不足。在这些情况下，建议减少粪便物质质量，如 50mg。对于困难的粪便样本，如脂质、多糖或富含蛋白质的粪便，建议使用 60-100mg 开始提取，减少起始物质也可能提高裂解效率和 DNA 的纯度。处理液体粪便样品，建议取 0.2ml 进行操作，若样品中水份较多，可以取转移的样品离心后去除多余的水份，残渣和残液总体积不要超过 0.2ml。由于粪便样品中含有较多的脂类，加入 0.8ml Buffer STL 时，可以再补加入 0.2ml Buffer PCI（酚氯仿，货号 C493）至样品中，提高脂质去除效果，获得更清的上清液。
- 干燥的环境类样品使用前，可以用筛网尽可能清除异物，如树叶、石头或小树枝。对于非常干燥的材料，如果样品材料吸收过多的裂解缓冲液，控制样品并适量增加 Buffer STL 的用量。对于非常潮湿的材料，在加入裂解缓冲液之前，可以离心后再去除多余的液体。控制样品用量以确定离心管有足够的空间进行珠磨裂解细胞壁。通常起始材料的减少也有助于提高裂解效率和提高 DNA 的纯度。
- 水体微生物 DNA 提取：可处理水样最大体积取决于样品（如来源和质量）和过滤膜（如类型、直径和孔径）。由于水样的浊度可以从清澈到高度浑浊不等。一般来说，可以处理大量的透明饮用水或饮用水，因为过滤器堵塞的可能性较低，可以处理 100 mL 到几升的体积。含有沉积物或悬浮颗粒的浊水样，如粘土、淤泥或其他无机或有机物，可能导致过滤器堵塞，对于这些样本类型，建议使用 0.45 $\mu$ m 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m) 过滤富集水体中微生物。使用无菌镊子从过滤装置取下过滤装置滤膜，将滤膜卷入圆柱体（含菌的一面朝内）并插入 2ml 匀浆管，然后加入 800 $\mu$ l Buffer STL，按步骤 3 进行操作。

## 第一部分：样品的裂解和消化

1. **准备匀浆管：**在 2ml 离心管或 2ml 螺口离心管中，加入 1 勺子氧化锆珠(0.8~1g)。
2. **根据样品类型进行样品前处理**
  - **固体样品（土壤类）：**在 2ml 匀浆管中，加入 0.25-0.5g 土壤，加入 0.8ml Buffer STL。
  - **固体样品（粪便类）：**在 2ml 匀浆管中，加入 50~200mg 粪便，加入 0.8ml Buffer STL。
  - **粪便悬液：**在 2ml 匀浆管中，加入 0.4ml 粪便悬液，加入 0.6ml Buffer STL。
  - **固体样品（食物、发酵固体、其它环境类样品）：**在 2ml 匀浆管中，加入 0.2 食物、0.2-0.5g 发酵物残渣或环境类样品，加入 0.8ml Buffer STL。

- **液体样品：**在 2ml 匀浆管中，加入 0.4ml 培养液、发酵浓缩液、唾液、血浆、血清、全血、浸泡液、匀浆液、重悬液、液化痰液、微生物重悬液等样品，加入 0.5ml Buffer STL。
3. **根据实验室条件，选择珠磨进行裂解。**
- 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。珠磨裂解时间 10~15 min。
  - PowerLyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
  - 净信研磨仪：4500~5000rpm，振荡 45s，间停 20s，重复 2 次，共振荡 3 次，时间共 135s；
4. **13,000 × g 离心 1 分钟。**  
处理无色样品，如培养液，组织样品等非环境类样品，延长这一步离心时间，并省略第 5 步操作以简化操作步骤。
5. **转移 0.6ml 上清液至新的离心管中，加入 0.2ml Buffer SL，涡旋 10 秒。13,000 × g 离心 5 分钟得上清液备用。**

### 方案 1. 单管操作

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 30 $\mu$ l MagPure Particles 和 500 $\mu$ l Buffer GDP。
2. 转移 500~600 $\mu$ l 上清液（第 5 步）至含有 GDP 和磁珠的离心管中。颠倒混匀 10-15 次，室温放置 5~10 分钟，其间涡旋混匀几次。转移至磁力架上吸附 2 分钟，倒弃或吸弃溶液。
3. 加入 500 $\mu$ l Buffer GDP，**涡旋 10 秒**。转移至磁力架上吸附 1 分钟，倒弃或吸弃溶液。
4. 加入 500 $\mu$ l Buffer BW1，**涡旋 10 秒**。转移至磁力架上吸附 1 分钟，倒弃或吸弃溶液。
5. 加入 750 $\mu$ l 75%乙醇，**涡旋 10 秒**。转移至磁力架上吸附 1 分钟，倒弃或吸弃溶液。
6. 加入 750 $\mu$ l 75%乙醇，**涡旋 10 秒**。转移至磁力架上吸附 1 分钟，倒弃或吸弃溶液。
7. 短暂离心收集管壁上液滴，转移至磁力架上，吸尽残液。空气干燥 10 分钟。
8. 加入 100 $\mu$ l Elution Buffer，**涡旋打散磁珠**。55 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。若无振荡温匀，其间涡旋混匀 2~3 次加速 DNA 的溶解。
9. 转移至磁力架上吸附 5 分钟，把 DNA 转移至新的离心管中。

## 方案 2: 32/48/96 通道核酸提取仪操作

- 瓶装试剂：按预分装试剂表格所示，按各种试剂分装至 96 孔板的对应孔中。  
预分装试剂：颠倒 96 孔板让磁珠充分悬浮，正放 1 分钟后，去除封口袋和封口膜。
- 32 通道高纯度方案：在第 1/7 排孔中，加入 400~450 $\mu$ l 上清液。  
32 通道高产量方案：在第 1/7，第 2/8 排孔中，分别加入 350~400 $\mu$ l 上清液。  
96 通道高纯度方案：在样品板 1 中，加入 400~450 $\mu$ l 上清液。  
96 通道高产量方案：在样品板 1 和样品板 2 中，分别加入 350~400 $\mu$ l 上清液。
- 把磁力外套插到仪器中，把 96 孔板放到仪器中。编写程序，并启动对应程序。约 30 分钟，提取结束。
- 取出 96 孔板和磁力外套。把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中，把产物保存于-20~-8 $^{\circ}$ C。
- MagMix 16/32/48/96 核酸提取仪参数

| 序号 | 步骤名称 | 孔位 | 容积  | 混合时间 |    | 等待      |    | 磁吸时间 |    |    | 吸磁 | 加热 |    |
|----|------|----|-----|------|----|---------|----|------|----|----|----|----|----|
|    |      |    |     | 时间   | 速度 | 时间      | 位置 | 升降   | 液面 | 底部 |    | 板位 | 温度 |
| 1  | 吸磁   | 4  | 500 | 30s  | 8  | 0       | 0  | 60s  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 2  | 结合1  | 1  | 800 | 240s | 8  | 0       | 0  | 90s  | 10 | 10 | 自动 | /  | /  |
| 3  | 结合2  | 2  | 800 | 240s | 8  | 0       | 0  | 90s  | 10 | 10 | 自动 | /  | /  |
| 4  | 清洗   | 3  | 500 | 90s  | 8  | 0       | 0  | 60s  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 5  | 清洗   | 4  | 500 | 90s  | 8  | 0       | 0  | 60s  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 6  | 清洗   | 5  | 500 | 90s  | 8  | 0       | 0  | 60s  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 7  | 干燥   | 5  | 0   | 0    | 0  | 6min/晾干 |    | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 8  | 洗脱   | 6  | 100 | 400s | 9  | 0       | 0  | 60s  | 0  | 0  | 自动 | 6  | 55 |
| 9  | 弃磁1  | 5  | 500 | 30s  | 9  | 1min/晾干 |    | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 10 | 洗脱   | 6  | 100 | 60s  | 9  | 0       | 0  | 90s  | 0  | 50 | 自动 | /  | /  |
| 11 | 弃磁2  | 5  | 500 | 30s  | 9  | 0       | 0  | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |