

【产品名称】磁珠法微生物 DNA 富集试剂盒

【预期用途】本产品适合于从血液、血清、血浆、拭子浸泡液、积液、匀浆液等样品提取病原总核酸或富集提取微生物总 DNA。试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术。洗脱的 DNA/RNA 可直接用于 PCR、病毒检测、二代测序等实验。

【检验原理】本产品基于高结合力的磁性粒子的纯化方式。样品在消化液和蛋白酶 K 作用下裂解消化，DNA/RNA 释放到消化液中，加入磁性粒子和结合液后，DNA/RNA 会吸附在磁性粒子的表面，而蛋白质等杂质则不被吸附而去除。吸附了 DNA/RNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和杂质，最后 DNA/RNA 被洗脱液 AVE 洗脱。

【主要组成成份】

产品编号	D6360-00	D6360-01	D6360-02
纯化次数	24 人份	48 人份	96 人份
DNase I (Powder)	10 mg	10 mg	15 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml
DNase Buffer	6 ml	12 ml	24 ml
Buffer LBX1	30 ml	60 ml	110 ml
Buffer SDS	1.8 ml	3 ml	6 ml
研磨管	24 个	48 个	96 个
消化液 MTL	10 ml	20 ml	35 ml
蛋白酶 K	0.8 ml	1.5 ml	3 ml
磁珠液 MPN9	1.0 ml	1.8 ml	3.5 ml
结合液 MLB	30 ml	35 ml	70 ml
洗涤液 MW1	13 ml	22 ml	44 ml
洗涤液 MW2	10 ml	20 ml	50 ml
洗脱液 AVE	10 ml	20 ml	20 ml

【储存条件及有效期】

本产品室温运输，长期保存时，把蛋白酶 K、DNase I 和磁珠液 MPN9 保存于 2-8℃，其余产品保存于室温，有效期 18 个月。

【准备工作】

- 溶解 DNase I: 加入 1.0ml (10mg) 或 1.5ml (15mg) 蛋白酶溶解液至 DNase I 干粉中，混匀溶解后保存于 -20℃。
- 使用前，洗涤液 MW1/MW2，按标签所示，加入适量的无水乙醇进行稀释。

第一部分：样品前处理流程

A: 病原总核酸提取

1. 在研磨管，加入 50µl 消化液 SDS (20%) 和 20µl 蛋白酶 K。
2. 转移 0.5ml 全血、血水、积液、血清、血浆、匀浆液、拭子浸泡液等体液样品至研磨管中，旋紧盖子。
3. 转移至带泡棉夹具的涡旋仪上高速涡旋 10 分钟或珠磨仪进行高速珠磨 60~90 秒。
 - 涡旋仪: 推荐使用涡旋仪 MagMix A，可一次高效处理 10~20 个样品。
 - 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 x g 离心 1 分钟，按第 2/3 部分进行操作。

B: 细菌或真菌微生物 DNA 富集提取

- 取 0.5~0.75ml 全血、血浆、积液、匀浆液、细胞悬液、拭子浸泡液等体液至 2.0 ml 离心管中。处理大体积样品：取适量的样品至离心管中，13,000 x g 离心 5 分钟收集微生物细胞，吸弃上清液，余下 0.5ml 残液和沉淀，涡旋重悬后按第二步进行操作。痰液建议用 DTT 进行液化处理。
- 加入 1 ml Buffer LBX1 和 5µl Proteinase K，颠倒 6-8 次，室温放置 10 分钟裂解真核细胞。
- 13,000 x g 离心 5 分钟收集细菌或真菌等微生物，弃去上清液，余下~50µl 残液和沉淀，涡旋重悬沉淀。
- 加入 200µl DNase Buffer 和 10µl DNase I，室温 700~900rpm 振荡 15~30 min 消化真核细胞 DNA。
- 加入 200µl Buffer MTL 和 20µl Proteinase K，涡旋混匀，室温放置 10 分钟消化降解 DNase。
- 把全部混匀液转移至研磨管中，旋紧盖子，转移至带泡棉夹具的涡旋仪上高速涡旋 10 分钟或珠磨仪进行高速珠磨 60~90 秒。
 - 涡旋仪：推荐使用涡旋仪 MagMix A，可一次高效处理 10~20 个样品。
 - 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；
- 13,000 x g 离心 1 分钟，取上清液，按第 2/3 部分进行操作。

第二部分：手工抽提流程

- 转移 250µl 消化液至新的 2ml 离心管中，入 0.6ml 结合液 MLB 和 30µl 磁珠液 MPN9，室温颠倒混匀 6 分钟，转移至磁力架上，静置 2 分钟吸附磁珠，吸弃溶液。
- 加入 500µl 洗涤液 MW1，涡旋混匀 10 秒。转移至磁力架上，静置 1 分钟，吸弃所有溶液。
- 加入 500µl 洗涤液 MW1，涡旋混匀 10 秒。转移至磁力架上，静置 1 分钟，吸弃所有溶液。
- 加入 500µl 洗涤液 MW2，涡旋混匀 10 秒。转移至磁力架上，静置 1 分钟，吸弃所有溶液。
- 重复第 4 步一次。
- 短暂离心，收集管壁上的液滴，吸弃所有溶液，空气干燥 10 分钟。
- 加 50~100µl 洗脱液 AVE 或灭菌水等缓冲液，涡旋打散磁珠。室温放置 10 分钟，其间轻轻振荡 1~2 次加速溶解。转移至磁力架上，静置 3 分钟。转移 DNA/RNA 溶液至新的 1.5ml 离心管中。

第三部分：32/48 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。

孔位	预装试剂	使用前加入
第 1/7 排孔	600µl 结合液 MLB	250µl 上清液
第 2/8 排孔	600µl 洗涤液 MW1	
第 3/9 排孔	600µl 洗涤液 MW1	
第 4/10 排孔	600µl 洗涤液 MW2, 30µl 磁珠液 MPN9	
第 5/11 排孔	600µl 洗涤液 MW2	
第 6/12 排孔	70µl 洗脱液 AVE	

- 在第 1/7 排孔中，加入 250µl 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 40 分钟提取结束，取出 96 孔板和磁力外套。把 RNA 转移至 1.5ml 离心管中，把产物保存于 -20~8℃。

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	20s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
2	结合1	1	700	400s	8	0	0	90s	30	30	自动	/	/
3	清洗1	2	500	60s	8	0	0	60s	10	10	自动	/	/
4	清洗2	3	500	60s	8	0	0	60s	10	10	自动	/	/
5	清洗3	4	500	60s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
6	清洗4	5	500	60s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
7	干燥	5	500	0	8	3	0	0	0	0	自动	/	/
8	洗脱	6	100	300s	9	0	0	60s	0	50	自动	6	55
9	弃磁	5	500	30s	9	0	0	0	0	0	自动	/	/