

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。

产品组份： 预分装试剂

货号	预分装试剂和装量	D6357-TL-06 96 人份	D6357-F-96 96 人份
2ml 研磨管 B		96 个	96 个
Buffer SXL		90 ml	90 ml
Buffer XL		30 ml	30 ml
8 联磁力外套		12 个	/
96 孔磁套		/	1 个
预装试剂板	1/7 孔或样品板：500 μ l Buffer GDP	6 块	1 个
	2/8 孔或清洗板 1：500 μ l Buffer GDP		1 个
	3/9 孔或清洗板 2：500 μ l Buffer BW1		1 个
	4/10 或清洗板 3：500 μ l Buffer GW2 30 μ l MagPure Particles		1 个
	5/11 孔或清洗板 4：500 μ l Buffer GW2		1 个
	6/12 孔或洗脱板：100 μ l Elution Buffer		1 个

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： 瓶装试剂

产品编号	D6357-01	D6357-02	D6357-03
纯化次数	48 次	96 次	480 次
2ml 研磨管 B	48 次	96 次	480 次
MagPure Particles	2.5 ml	3.5 ml	17 ml
Buffer SXL	50 ml	90 ml	450 ml
Buffer XL	15 ml	25 ml	110 ml
Buffer GDP	70 ml	120 ml	500 ml
Buffer BW1 *	13 ml	26 ml	110 ml
Elution Buffer	10 ml	15 ml	60 ml

保存条件 本产品室温运输保存收到产品 MagPure Particles 保存于 2~8℃，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 SXL 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 SXL 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 0.45µm 的过滤器。使用合适的过滤器，用直径为 25 mm 的过滤膜(0.2um 或 0.45µm) 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 研磨管，然后加入 800µL Buffer SXL，按第一部分步骤 2 进行操作。
- 低温下，Buffer SXL 可能会有沉淀析出，55 度温育 10-15 分钟溶解并颠倒混匀使用。Buffer SXL 含有少量的消泡剂，久置时消泡剂会浮在溶液表面，使用前颠倒数次混匀再使用。
- Buffer BW1 * 按标签要求添加乙醇

第一部分：样品的裂解和消化

1. 根据样品类型进行样品前处理

- **固体样品（土壤类）：**加入 0.25-0.5g 土壤至研磨管，加入 0.8ml Buffer SXL。
- **固体样品（粪便类）：**加入 50~200mg 粪便至研磨管，加入 0.8ml Buffer SXL。
- **粪便悬液：**在 2ml 研磨管中，加入 0.4ml 粪便悬液，加入 0.4ml Buffer SXL。
- **固体样品（食物、发酵固体、其它环境类样品）：**在 2ml 研磨管中，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 SXL。
- **液体样品：**在 2ml 研磨管中，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 0.4ml Buffer SXL。

2. 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 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，共振振荡 3 次，时间共 135s。

3. 13,000 x 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 4 步操作以简化操作步骤。

4. 转移 0.6ml 上清液至新的离心管中，加入 0.2ml Buffer XL，涡旋 10 秒。13,000 x 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 μ l MagPure Particles 和 500 μ l Buffer GDP。
2. 转移 500 μ l 上清液（第 4 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。

- 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。
- 加入 100 μ 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。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 μ 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 μ l 上清液。
96 通道高纯度方案：在样品板 1 中，加入 400~450 μ 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 μ 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	1	45
3	结合2	2	800	240s	8	0	0	90s	10	10	自动	1	45
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	5min/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	/	/