

【产品名称】

通用名称：核酸提取或纯化试剂 商用名称：磁珠法病原 DNA/RNA 富集试剂盒

【包装规格】

72 人份/盒, 96 人份/盒, 24 人份/盒 (测试)

【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 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	R6672-00C, 测试	R6672-01C	R6672-02C
纯化次数	24 人份	72 人份	96 人份
2ml 匀浆管(0.4g)	24 个	72 个	96 个
DNase I (Powder)	10 mg	10 mg	15 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml
DNase Buffer	5 ml	15 ml	20 ml
裂解液 LB1	30 ml	100 ml	120 ml
消化液 ES	5 ml	10 ml	15 ml
裂解增强剂	0.2 ml	0.5 ml	0.6 ml
蛋白酶 K (JP)	1.2 ml	3.5 ml	5.0 ml
磁珠液 MPN9	1.2 ml	3.5 ml	5.0 ml
结合液 MLB	30 ml	90 ml	120 ml
洗涤液 MW1	13 ml	44 ml	110 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) Protease Dissolve Buffer 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: 总核酸提取

1. 转移 1.0~1.5ml 全血、血水、积液、血清、血浆、匀浆液、拭子浸泡液等体液样品至 2ml 离心管中，于 500 x g 离心 10 分钟去除真核细胞。
2. 在 2ml 匀浆管，加入 100µl 消化液 ES 和 40µl 蛋白酶 K，加入 0.5ml 待测样品的上清液，旋紧盖子。转移至涡旋仪上高速涡旋 10 分钟或使用珠磨仪进行高速珠磨 30-60 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；
3. 13,000 x g 离心 3 分钟，按第 2/3 部分进行操作。

B: 病原总核酸富集提取

1. 取 1.0~1.5ml 全血、匀浆液、细胞悬液、拭子浸泡液等体液至 2ml 离心管中，10,000 x g 离心 1 分钟。转移 0.5~0.75ml 上清液（含病毒和支原体）至离心管中，用于病毒和支原体提取（按第 2/3 部分进行操作）。余下不超过 0.7ml 的细胞沉淀和残液，涡旋充分重悬后，按第 2 步进行操作。

- 加入 1.0ml 裂解液 LB1 和 3 μ l 裂解增强剂，颠倒混匀 10~15 次。10,000 \times g 离心 10 分钟收集微生物，小心吸弃全部上清液。
- 加入 400 μ l DNase Buffer 和 1 μ l 裂解增强剂，涡旋重悬沉淀。
- 加入 3/10 μ l DNase I，室温振荡 (600-900rpm) 温育 30 分钟消化真核细胞 DNA 和 RNA。
- 加入 100 μ l Buffer ES 和 20 μ l Proteinase K，颠倒混匀，然后全部转移至匀浆管，旋紧盖子。转移至涡旋仪上高速涡旋 10 分钟或使用珠磨仪进行高速珠磨 30~90 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：4500rpm，振荡 45s，间停 20s，重复 2 次，共振振荡 3 次，时间共 135s。
- 13,000 \times g 离心 2 分钟，按第 2/3 部分进行操作。

第二部分：手工抽提流程

- 在 2.0ml 离心管中，加入 20 μ l Proteinase K，加入 250 μ l 珠磨液（方案 B 的第 6 步）和 250 μ l 病毒液（方案 B 的第 1 步上清液），颠倒混匀 3-5 次，室温放置 5-10 分钟。
处理 A 方案（不富集）时，取 0.5ml 珠磨液，按第 2 步进行操作。
处理 B 方案时，若只需要微生物(细菌或真菌)核酸时，取 0.5ml 珠磨液按第 2 步进行操作。
- 加入 1.0ml 结合液 MLB 和 40 μ l 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 500 μ l 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 500 μ l 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 500 μ l 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。
- 加入 500 μ l 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。
- 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 50~100 μ l 洗脱液 AVE，涡旋打散磁珠。50~55 $^{\circ}$ C 振荡温育 5~10 分钟。
- 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	500 μ l 结合液MLB	250 μ l微生物珠磨液（方案B的第6步） 或250 μ l上清液（方案B的第1步）和20 μ l Proteinase K
第2/8排孔	500 μ l 结合液 MLB	250 μ l 微生物珠磨液（方案 B 的第 6 步）
第3/9排孔	500 μ l 洗涤液 MW1	
第4/10排孔	500 μ l 洗涤液MW2 30 μ l 磁珠液MPN9	
第5/11排孔	500 μ l 洗涤液MW2	
第6/12排孔	80 μ l 洗脱液AVE	

注：处理 A 方案（不富集）时，把 0.5ml 匀浆液分成两份，分别加入第 1/7 和 2/8 排孔中。

处理 B 方案时，若只需微生物(细菌或真菌)核酸时，取 0.5ml 珠磨液分别加入第 1/7 和 2/8 排孔中。

- 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 DNA/RNA 转移至 1.5ml 离心管中，把产物保存于 -20~-8 $^{\circ}$ C。

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	700	360s	8	0	0	90s	10	30	自动	/	55
3	结合2	2	700	240s	8	0	0	90s	10	30	自动	/	/
4	清洗2	3	500	90s	8	0	0	90s	0	0	自动	/	/
5	清洗3	4	500	90s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
6	清洗4	5	500	90s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
7	干燥	5	500	0	8	3min	0	0	0	0	自动	/	/
8	洗脱	6	100	360s	9	0	0	90s	0	50	自动	/	55
9	弃磁	5	500	30s	9	0	0	0	0	0	自动	/	/