

GNM 支原体样品前处理试剂盒(磁珠法) 说明书

货 号:

HCD0203-050(50T)

一、预期用途

GNM 支原体样品前处理试剂盒(磁珠法)适用于生物原料、细胞库、病毒种子、培养过程样品、细胞制品的支原体核酸提取前处理，对高浓度细胞（不大于 10^7 个）、5%人血白蛋白等复杂基质生物制品均适用，可稳定高效地提取样品中的微量支原体 DNA。

该试剂盒可与支原体检测试剂盒(qPCR)配套使用。

二、产品原理

该试剂盒基于磁珠法检测原理，能从生物制品样品中分离出支原体 DNA。蛋白酶 K 消化样品，在一定条件下磁珠与 DNA 特异性结合，利用磁性分离器分离磁珠与溶液，洗涤去除杂质，最后用洗脱液使磁珠释放吸附，得到高纯度的 DNA。整个过程安全便捷，无需酚/氯仿等试剂。

三、试剂盒规格及组分

序号	组分名称	HCD0203-050 (50T)	保存
BoxI	蛋白酶 K Buffer II	4mL	RT
	细胞分离缓冲液	1 mL×2 管	RT
	裂解液 II	25mL	RT
	清洗液 A	30mL	RT
	清洗液 B	9mL	RT
	洗脱液	8mL	RT
	P 磁珠*	750μL	2~8°C
BoxII	蛋白酶 K(20mg/mL)	1mL	-20±5°C
	5M NaCl	1mL	-20±5°C
	糖原	500μL	-20±5°C
	tRNA	20μL	-20±5°C

*P 磁珠常温运输，2~8°C 储存。

四、储存条件及有效期

BoxI常温运输，收货后 P 磁珠 2~8℃储存，其他常温储存；

BoxII干冰或冰袋运输，收货后低温-20±5℃储存；

试剂盒收货后有效期 1 年。

五、相关设备、耗材及试剂

一次性无尘手套、1.5mL 无菌低吸附离心管、磁力架/全自动磁珠提取仪、移液器、10μL 枪头、20μL 枪头、100μL 枪头、200μL 枪头、1000μL 枪头、涡旋混匀仪、小型离心机、恒温混匀仪、超净台、无水乙醇、异丙醇、1×PBS。

六、实验流程

1. 缓冲液制备

- 首次使用试剂盒前，向清洗液B 中加入标签指定量的无水乙醇，如 9mL 的清洗液B 中加无水乙醇21mL，1.5mL 的清洗液 B 中加无水乙醇 3.5mL，并在标签的□上打√做好标记
- 准备异丙醇
- 将低温-20±5℃储存试剂解冻
- 根据样品量，提前配制**蛋白酶 k/蛋白酶 k Buffer II**：

试剂	每次反应加入量
蛋白酶 k 20mg/ml	10 μL
蛋白酶 kbuffer II	60 μL

- 根据样品量，提前配制**裂解/结合液**：

试剂	每次反应加入量
裂解液 II	351.5μL
糖原	8.3μL
tRNA*	0.2μL

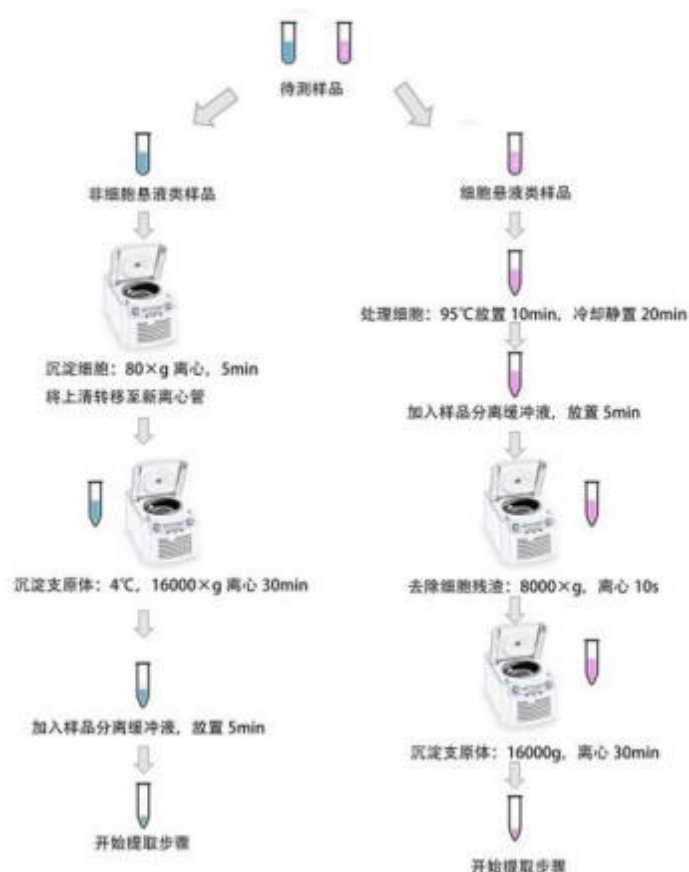
2. 样品处理、仪器准备

- 冷冻样品应提前置于 2~8℃条件下自然解冻，待完全解冻后，方可取样。
- 对于样品体积小于 100μL 的样品，可以直接使用本试剂盒进行提取；对于超过此体积的，可通过离心将样品浓缩至终体积为约 100μL，再使用本试剂盒进行支原体 DNA 提取纯化。
- 若使用前发现蛋白酶 K Buffer II 出现结晶或沉淀，应 37℃水浴处理，待完全溶解后，振荡混匀。

- d) 提前开启恒温混匀仪，设置温度 57°C。
- e) 打开离心机，设置温度 4°C。

3. 实验步骤

A、样品处理流程如下：



B、样品处理步骤：

非细胞悬液类样品：

- a) 80×g 离心5min，使细胞沉淀，将上清转移至新离心管中。（注：非细胞上清类样本无需此步骤。）
- b) 将上清液在 4°C下 16000×g 离心 30min，使支原体沉淀。
- c) 吸弃上清至剩余 50μL 样品（注：不要直接倒出液体，吸弃时避免触碰沉淀），加入 50μL 1×PBS 重新振荡混匀，使之重悬。
- d) 加入 0.1 倍样品体积的细胞分离缓冲液，振荡混匀，室温放置处理 5min。

- e) 进入提取步骤

细胞悬液类样品($\leq 10^7$ 个细胞)：

- a) 样品 95°C放置 10min 热处理，再 2~8°C冷却 20min。
- b) 加入 0.1 倍样品体积的细胞分离缓冲液，振荡混匀，室温放置处理 5min。
- c) 8000×g 离心 10s，去除细胞碎片，将上清转移至新的离心管中。
- d) 将上清 16000×g 离心 30min，沉淀支原体。
- e) 弃去上清剩余至 50μL 样品（注：不要直接倒出液体，吸弃时避免触碰沉淀），加入 50μL 1×PBS 重新振荡混匀，使之重悬。
- f) 进入提取步骤

对照样品

- a) **阴性**对照品：取 100μL 1×PBS 作为阴性对照品
- b) **阳性**对照品：取支原体阳性对照品/内部质控（内部质控 PC 为相应支原体检测试剂盒），加入 1×PBS 或样品基质至 100μL，混匀离心，作为阳性对照品。
- c) 进入提取步骤

C、操作方法(手工提取)

- a) 开始提取程序前，将各组分试剂置于室温，振荡混匀。
- b) 在**样本处理步骤**后的溶液中（约 100μL），加入 10μL 5M NaCl、70μL 蛋白酶 K/蛋白酶 K Buffer II，涡旋混匀 5s。
- c) 离心管置于恒温混匀仪上，57°C孵育 15min。（如果样本蛋白浓度较高，可将孵育时间增加到 30min。同时如果蛋白浓度过低，会有白色絮状物析出，在步骤 e 加入异丙醇后会消失，不影响回收效率）。
- d) 取下离心管，加入 360μL 裂解/结合液，涡旋混匀5s，室温放置 15min。
- e) 将 P 磁珠完全重悬，向离心管中加入 400μL 异丙醇、10μL P 磁珠悬浮液，涡旋混匀 5s。
- f) 离心管置于恒温混匀仪上，室温下 1200 rpm 混匀 5min。
- g) 离心管 15000×g 离心5s，将离心管置于磁力架上静置 2~5min，待磁珠完全被吸附后，在不干扰磁珠的情况下，使用移液器去除上清液。

- h) 向离心管中加入 300 μ L 清洗液 A，涡旋混匀 15s，15000 \times g 离心 5s 后置于磁力架上静置 2~5min，待磁珠完全被吸附后，在不干扰磁珠的情况下，使用移液器去除上清液。
- i) 向离心管中加入 300 μ L 清洗液 B，涡旋混匀 15s，15000 \times g 离心 5s 后置于磁力架上静置 2~5min，待磁珠完全被吸附后，在不干扰磁珠的情况下，使用移液器去除上清液。
- j) 将离心管瞬时离心后，置于磁力架上，吸弃管底部残留的洗涤缓冲液。打开管盖，室温干燥 30s~5min，除去残留乙醇。（注：乙醇残留会影响后续实验，晾干时要确保乙醇挥发干净，但也不可过于干燥，否则核酸将很难溶解。）
- k) 加入 50-100 μ L 洗脱液，涡旋混匀 15s 重悬磁珠，置于恒温混匀仪上，55 $^{\circ}$ C 1200rpm 混匀 5min。
- l) 离心管瞬时离心后，置于磁力架上约 30s（若离心管壁附着磁珠，用离心管内的洗脱液冲洗管壁上的磁珠），待磁珠完全吸附，小心地将溶液转移至干净的离心管中。纯化的 DNA 可立即使用，也可-20 $^{\circ}$ C 长期储存。（注：请勿吸入磁珠，磁珠残留会干扰后续实验。）

D、操作方法(仪器提取)

- a) 在开始提取程序前，将各组分试剂置于室温，振荡混匀。
- b) 取 100 μ L 待测样品溶液，加入 10 μ L 5M NaCl、70 μ L 蛋白酶 K/蛋白酶 KBuffer II，至 1.5mL 离心管，涡旋混匀 5s。
- c) 离心管置于恒温混匀仪上，57 $^{\circ}$ C 孵育 15min（如果样本蛋白浓度较高，消化后不透明，可将孵育时间增加到 30min，同时如果蛋白浓度过低，会有白色絮状物析出，在步骤 h 后会消失，不影响回收效率）。
- d) 将 P 磁珠完全重悬，在第一列或第七列加入 360 μ L 裂解/结合液、400 μ L 异丙醇、15 μ L P 磁珠悬浮液。
- e) 在第二列或第八列中加入 300 μ L 清洗液 A。
- f) 在第三列或第九列中加入 300 μ L 清洗液 B。
- g) 在第六列或第十二列中加入 100 μ L 洗脱液。
- h) 在第一列或第七列中加入步骤c) 消化后的全部样品。
- i) 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置。
- j) 把塑料磁力套插入相应位置。
- k) 点击“运行”相应程序。
- l) 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化产物全部转移到新的离心管。纯化的 DNA 可立即使用，也可-20 $^{\circ}$ C 长期储存。

	第一组						第二组					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1						PCS					
B	S1						PCS					
C	S2											
D	S2											
E	S3											
F	S3											
G	S4						NCS					
H	S4						NCS					
	样品 消化产物	清洗 液 A	清洗 液 B			洗脱 液	样品 消化产物	清洗 液 A	清洗 液 B			洗脱 液

注：根据不同的机型可以调整相应试剂位置及体积，运行对应程序。

七、注意事项

- 若蛋白酶 K Buffer II 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- 实验操作过程中，轻轻打开管盖，勿将液体溅出。
- 在提取 DNA/RNA 之前，用 1X PBS(不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+})或 50 mM Tris(pH 8.0, 0.5 M NaCl)溶液稀释测试样品，在水中或 TE 中稀释样品会降低提取效率。
- 磁珠在静置后会发生沉降，使用前务必使磁珠与溶液充分混匀，磁珠聚集对于提取的得率与纯度均有较大影响。
- 样品前处理完成后，请尽量当天进行后续 DNA 残留检测，以保证检测结果的准确性。
- 本产品仅供一次性使用，用后按《医疗卫生机构医疗废物管理办法》或其它相关法律法规处理。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。