

# GNM 真菌&细菌 DNA提取纯化试剂盒(磁珠法) 说明书

货 号:

**HCD0205-050 (50T)**

## 一、预期用途

GNM 真菌&细菌 DNA提取纯化试剂盒(磁珠法)可用于对生物样品中微量的真菌与细菌 DNA 进行提取和纯化，也可用于植物 DNA 提取纯化。其适用的样品涵盖主细胞库、工作细胞库等细胞培养物，以及疫苗、细胞治疗产品等生物制品，同时对于高浓度细胞（不超过  $10^6$  个细胞）等复杂基质的生物制品也同样适用。此产品能够与本公司的细菌 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）以及真菌 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）配套使用。与对应的检测试剂盒搭配后，其检测限可达到 10 CFU/反应。

本试剂盒能够在 N32 全自动核酸提取仪上实现对样品的自动化处理。

## 二、产品原理

该试剂盒基于磁珠法检测原理，能从生物样品中分离出核酸 DNA。借助破壁仪破壁细胞，利用蛋白酶 K 对破壁后的样品进行消化，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	HCD0205-050 (50T)	保存
BoxI	蛋白酶 K Buffer II	8mL	RT
	裂解液 III	50mL	RT
	清洗液 A	70mL	RT
	清洗液 B	21mL	RT
	洗脱液	15mL	RT
	P 磁珠*	1.5mL	2~8°C
BoxII	蛋白酶 K (20mg/mL)	2mL	-20±5°C
	5M NaCl	2mL	-20±5°C
	糖原	1mL	-20±5°C
	tRNA	50μL	-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、高速离心机、恒温混匀仪、破壁仪、超净台、无水乙醇、异丙醇、核酸清除剂。

## 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 21mL 的清洗液 B 中加无水乙醇 49mL，4.5mL 的清洗液 B 中加无水乙醇 10.5mL，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 III	351.5μL
糖原	8.3μL
酵母 tRNA	0.2μL

## 2. 样品准备

### 样品处理

- f) 冷冻样品应提前置于 2~8°C 条件下自然解冻，待完全解冻后，方可取样。
- g) 对于样品体积小于 100 $\mu$ L 的样品，可以用 1X PBS 补足至 100 $\mu$ L，使用本试剂盒进行提取。
- h) 对于超过 100 $\mu$ L 的样品，可通过 4°C 下 16000 $\times$ g 离心 30 分钟，将样品浓缩至终体积为约 100 $\mu$ L，使用本试剂盒进行提取。
- i) 若使用前发现出现结晶或沉淀，应 37°C 水浴处理，待完全溶解后，振荡混匀。
- j) 在样品中加入 10  $\mu$ L 5M NaCl、70 $\mu$ L 蛋白酶 k/蛋白酶 k Buffer II

**破壁处理**（如果是做总真菌及细菌则必选，如果是已知少量物种，可根据本身实验室情况选择）

- a) 将样品处理管按照破壁仪（RFG-192）说明书要求对称放置于仪器上，拧紧压盖螺母，关闭顶盖直至自动扣紧。
- b) 选择自定义参数设置界面，根据提示设置速度、时间、循环数。推荐设置参数：5 米/秒，40 秒，1 循环条件下振荡处理。
- c) 将处理好的样品处理管于 4°C 下 16000 $\times$ g 离心 5 分钟，确保离心后的管内液体全部离心到底部，液面位置无明显泡沫存在。
- d) 离心后将样品上清液在对应操作区全部吸出，并转移至新的 1.5 mL 离心管（避免吸到底部白色颗粒）。

### 对照样品处理

阴性对照样品（NCS）

取与待测样品体积一致的稀释液，按照上述样品处理步骤进行处理。

阳性对照样品（PCS）

取真菌和细菌阳性菌株，分别加入稀释液或样品基质，推荐加入待测样品作为基质（总体积与待测样品体积保持一致），按照上述样品处理步骤进行处理。

## 3. 操作方法(手工提取)

- a) 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，消化后不透明，可将孵育时间增加到 30min）。
- b) 取下离心管，加入 360  $\mu$ L 裂解/结合液(如果样本蛋白浓度低，加入裂解/结合液后会有白色絮状沉淀产生，加入异丙醇混匀后会消失)，涡旋混匀 5s，室温放置 15min。

- c) 将 P 磁珠完全重悬，向离心管中加入 400 $\mu$ L 异丙醇、10 $\mu$ L P 磁珠悬浮液，涡旋混匀 5s。
- d) 离心管置于恒温混匀仪上，室温下 1200 rpm 混匀 5min。
- e) 离心管 15000 $\times$ 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。
- f) 向离心管中加入 300 $\mu$ 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。
- g) 向离心管中加入 300 $\mu$ 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。
- h) 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。）
- i) 加入 50-100 $\mu$ 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。
- j) 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。）

#### 4. 操作方法(提取仪)

- a) 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）。
- b) 将 P 磁珠完全重悬，在 96 深孔板第一列或第七列中分别依次加入 360 $\mu$ L 裂解/结合液，400 $\mu$ L 异丙醇、15 $\mu$ L P 磁珠悬浮液。
- c) 在 96 深孔板第二列或第八列中加入 300 $\mu$ L 清洗液 A。
- d) 在 96 深孔板第三列或第九列中加入 300 $\mu$ L 清洗液 B。
- e) 在 96 深孔板第六列或第十二列中加入 100 $\mu$ L 洗脱液。
- f) 在 96 深孔板**第一列或第七列**中加入步骤a) 消化后的全部样品。
- g) 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置。
- h) 把塑料磁力套插入相应位置。
- i) 点击“运行”相应程序。

- j) 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℃ 长期储存。

	第一组						第二组					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1						NCS					
B	S1						NCS					
C	S2											
D	S2											
E	S3											
F	S3											
G	S4											
H	S4											
	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

- a) 实验要根据样品类型进行分区：分为**阴性区、待测样品区、阳性区**。
- b) 工作区及环境进行适当地消毒，去除残留核酸。
- c) 使用**核酸清除剂**、75%酒精进行全方位擦拭消毒处理各区域超净工作台。
- d) 打开超净工作台紫外灯灭菌，保证照射时长不少于 1 小时；并打开各区域紫外设施灭菌，保证照射时长不少于 30 分钟。
- e) 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。
- f) 实验操作过程中，轻轻打开管盖，勿将液体溅出。
- g) 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。
- h) 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。
- i) 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