

# 分枝杆菌 DNA 提取纯化试剂盒(磁珠法)

## 说明书

货号：1503601

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 试剂盒简介

MycoSHENTEK®分枝杆菌 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）用于提取纯化生物制品中微量分枝杆菌 DNA，与 MycoSHENTEK®分枝杆菌 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）配套使用。

对于样品体积小于 400  $\mu\text{L}$  的样品，可以直接使用本试剂盒进行提取；对于需要增加取样体积以提高检测灵敏度的，建议通过离心的方法对样品进行浓缩至终体积为 100-400  $\mu\text{L}$  后，再使用本试剂盒进行分枝杆菌 DNA 的提取和纯化。

本试剂盒可以采用手动操作，也可以通过 rHCDpurify®实现样品的自动处理。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	裂解液	NND028	5 mL $\times$ 1 瓶	室温
	结合液	NND017	10 mL $\times$ 1 瓶	室温
	洗涤液 A	NND015	15 mL $\times$ 1 瓶	室温
	洗脱液	NND019	5 mL $\times$ 1 瓶	室温
	稀释液	NND022	5 mL $\times$ 1 瓶	室温
II	MB 细胞裂解液	NND039	1.25 mL $\times$ 2 管	2-8 $^{\circ}\text{C}$
	5M NaCl	NND040	500 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	2-8 $^{\circ}\text{C}$
	预处理液	NND041	1.25 mL $\times$ 2 管	2-8 $^{\circ}\text{C}$
	磁珠	NND034	1.25 mL $\times$ 2 管	2-8 $^{\circ}\text{C}$
	蛋白酶 K	NND024	1 mL $\times$ 1 管	2-8 $^{\circ}\text{C}$

## ■ 规格

50 Extractions。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 无水乙醇（分析纯）
- 100%异丙醇（分析纯）
- 阳性质控样品，联系本公司订购（分枝杆菌阳性对照品，货号 1503609）
- 1000  $\mu\text{L}$ ，100  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{L}$  无菌低吸附滤芯枪头
- 1.5 或 2.0 mL，50 mL 无菌低吸附离心管
- PCR 八联管或 96 孔板，相应管盖或覆膜

## ■ 相关设备

- 磁性分离架和 rHCDpurify®前处理系统
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 恒温金属浴
- 1000  $\mu\text{L}$ ，100  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{L}$  移液枪
- 生物安全柜或洁净工作台
- 荧光定量 PCR 仪
- 96 孔微孔板混匀仪

## ■ 实验操作流程

### 一、试剂、仪器准备

开启新试剂盒时需完成以下工作：

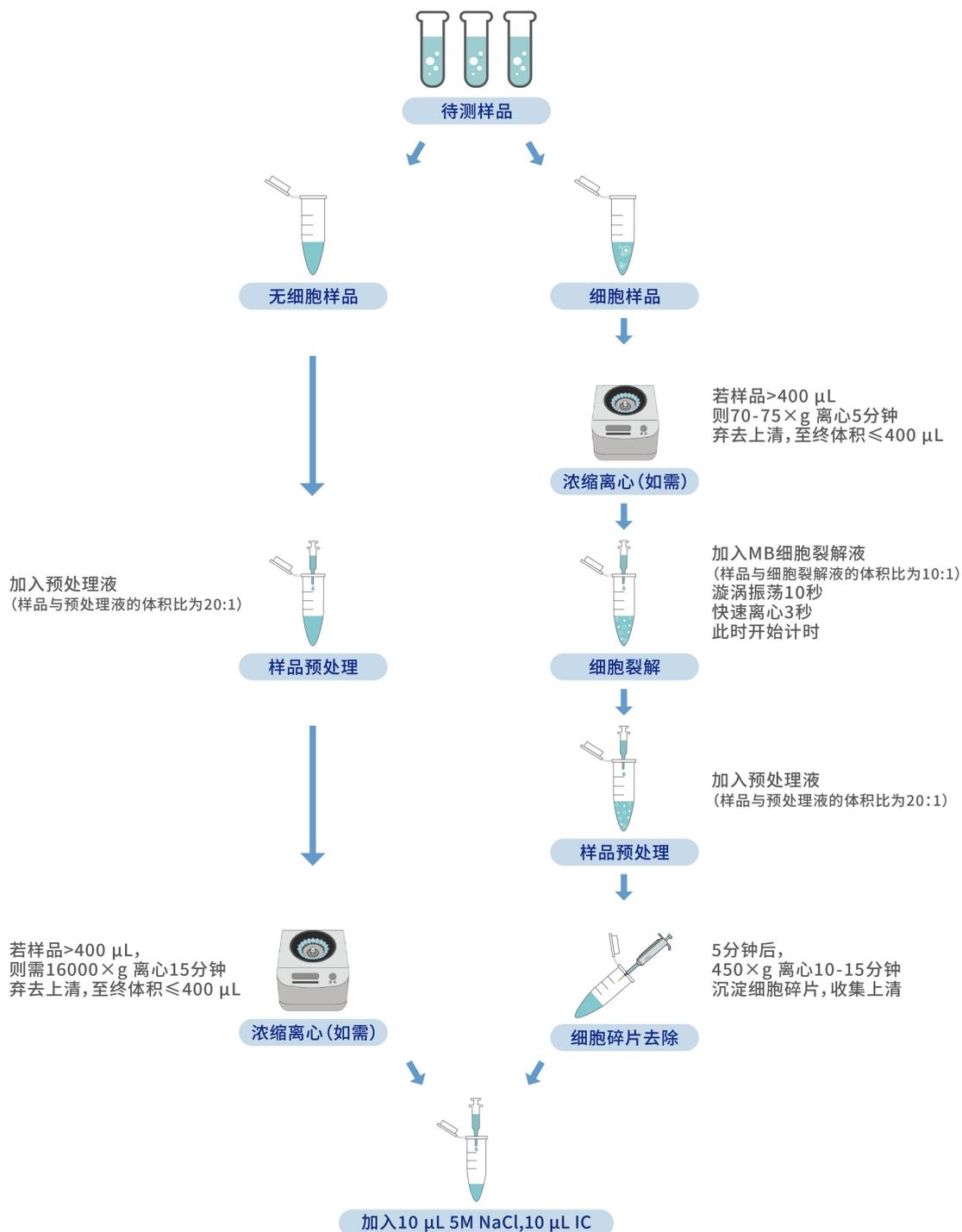
- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 20 mL 的无水乙醇。
- 在干净的试剂瓶中用无水乙醇和灭菌超纯水配制 70%乙醇溶液，标记为**洗涤液 B**。
- 配制后的洗涤液应密封，室温保存，防止乙醇挥发（注意使用效期）。

每次实验前需预先完成以下工作：

- 准备好 100%的异丙醇。
- 开启恒温金属浴，设置温度为 55 °C和 70 °C。
- 使用前若发现裂解液、结合液、预处理液出现结晶或沉淀，应 37 °C水浴，待完全溶解后，振荡混匀。
- 使用前应提前将磁珠置于室温环境下平衡 10 分钟，使用前涡旋振荡 10 秒混匀。

## 二、样品处理

◆ 待测样品处理操作流程如下：



其它基质样品可咨询湖州申科技术支持!

## 根据样品类型选择下述的样品处理步骤:

### ◆ 无细胞样品

1. 加入**预处理液**（样品与预处理液的体积比为 20:1），涡旋振荡混匀。
2. 若样品体积 $\leq 400 \mu\text{L}$ ，则可不作浓缩；若样品体积 $> 400 \mu\text{L}$ ，则需  $16000\times\text{g}$  离心 15 分钟，使用移液器移去上清，使剩余体积 $\leq 400 \mu\text{L}$ 。
3. 加入  $10 \mu\text{L}$  **5M NaCl**， $10 \mu\text{L}$  **IC**，涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒。

### ◆ 细胞样品

1. 若样品体积 $\leq 400 \mu\text{L}$ ，则可不作浓缩；若样品体积 $> 400 \mu\text{L}$ ，则  $70-75\times\text{g}$  离心 5 分钟，使用移液器移去部分上清，使剩余体积 $\leq 400 \mu\text{L}$ 。
2. 将细胞充分重悬混匀后加入 **MB 细胞裂解液**（样品与细胞裂解液的体积比为 10:1），涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒，此时开始计时。
3. 加入**预处理液**（样品与预处理液的体积比为 20:1），涡旋振荡混匀。
4. 5 分钟后， $450\times\text{g}$  离心 10-15 分钟沉淀细胞碎片，使用移液器尽可能多的吸取上清转移入新的离心管，但不要吸到沉淀物。
5. 加入  $10 \mu\text{L}$  **5M NaCl**， $10 \mu\text{L}$  **IC**，涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒。

### ◆ 对照样品处理

#### ➤ 阴性对照样品（NCS）

1. 取  $100 - 400 \mu\text{L}$  **稀释液**（体积可与待测样品体积保持一致）。
2. 加入**预处理液**（样品与预处理液的体积比为 20:1），涡旋振荡混匀。
3. 加入  $10 \mu\text{L}$  **5M NaCl**， $10 \mu\text{L}$  **LIC**，涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒。

#### ➤ 阳性对照样品（PCS）

1. 取 1 管分枝杆菌阳性对照品，快速离心 3 秒，加入**稀释液**或样品基质，涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒（总体积可与待测样品体积保持一致）。
2. 加入**预处理液**（样品与预处理液的体积比为 20:1），涡旋振荡混匀。
3. 加入  $10 \mu\text{L}$  **5M NaCl**， $10 \mu\text{L}$  **LIC**，涡旋振荡 10 秒，快速离心 3 秒。

## 三、样品消化

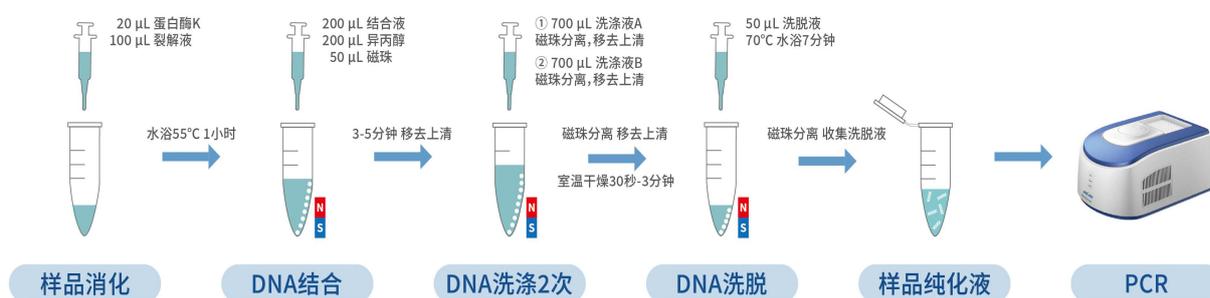
1. 在上述各管样品中，加入  $20 \mu\text{L}$  蛋白酶 K，振荡混匀。

- 再在上述各管中加入 100  $\mu\text{L}$  裂解液，振荡混匀后，55  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。
- 为了使样品消化更加完全，需要在温育至 30 分钟左右时再次进行涡旋振荡混匀后继续孵育）。

注意样品消化后需尽快进行下述的 DNA 提取实验！

## 四、DNA 提取

### （一）操作过程（手工操作）



#### ◆ 结合

- 将**磁珠**置于室温环境下 10 分钟，振荡混匀。
- 将样品快速离心 3 秒，加入 200  $\mu\text{L}$  **结合液**，200  $\mu\text{L}$  **异丙醇**，50  $\mu\text{L}$  **磁珠**。  
 如果样品较多，每次加入磁珠过程中应再次充分振荡磁珠混匀，以保证每次加入的磁珠量的一致性。
- 将装有全部混合物的离心管置于漩涡振荡器上振荡 5 分钟，快速离心 3 秒后静置于磁性分离架上。  
 快速离心的目的在于将附着在离心管盖和壁上的混合物甩至管底。
- 待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头小心移去上清。  
 等待磁珠完全分离的时间约为 3-5 分钟。  
 去除上清时枪头避免搅动磁珠，避免磁珠同上清一起被去除。

#### ◆ 洗涤

- 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700  $\mu\text{L}$  洗涤液 A，振荡 10 秒使磁珠和洗涤液 A 混匀；快速离心 3 秒后，将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 1 次磁珠洗涤。
- 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700  $\mu\text{L}$  洗涤液 B，振荡 40 秒

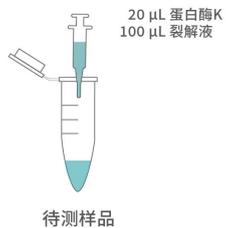
- 使磁珠和洗涤液 B 混匀; 快速离心 3 秒后, 将离心管重置于磁性分离架上。
- 待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 2 次磁珠洗涤。
3. 为保证液体充分移除, 可将离心管再次快速离心 3 秒, 置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 用 10  $\mu$ L 枪头小心的将残余液体吸除干净。
- ✚ 去除上清时枪头避免搅动磁珠, 避免磁珠同上清一起被去除。
4. 从磁性分离架上取下离心管, 打开管盖在室温下干燥 30 秒-3 分钟, 除去残留的乙醇。
- ✚ 干燥时间不可过长, 室温较高或空气干燥的环境下可以适当缩短干燥时间, 残留乙醇会影响下一步的检测反应。

#### ◆ 洗脱

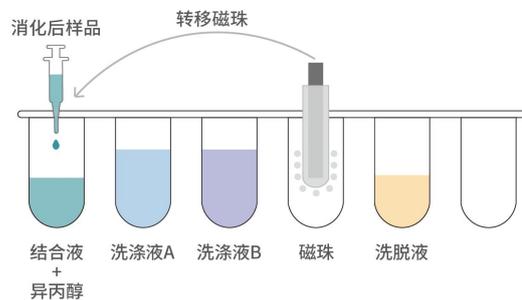
1. 沿离心管壁加入 50  $\mu$ L **洗脱液**, 用漩涡振荡器轻微振荡 10 秒使磁珠和洗脱液混匀, 70  $^{\circ}$ C 孵育 7 分钟, 孵育过程中可再次振荡混匀 2-3 次。
- ✚ 振荡时不要将磁珠和洗脱液振到管盖上。
  - ✚ 洗脱时应使洗脱液与磁珠充分混合均匀, 避免磁珠附着于离心管盖和壁上导致未能充分混匀。
2. 孵育完成后, 将离心管快速离心 3 秒, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头小心转移溶液到干净的离心管中。
3. 将上一步获得的离心管快速离心 3 秒, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头再次转移溶液到干净离心管, 所得即为样品纯化液。
- ✚ 收集洗脱液时, 应将离心管内溶液转移完全, 保证检测时所需 40  $\mu$ L 的量。

## (二) 操作过程 (rHCDpurify®前处理系统)

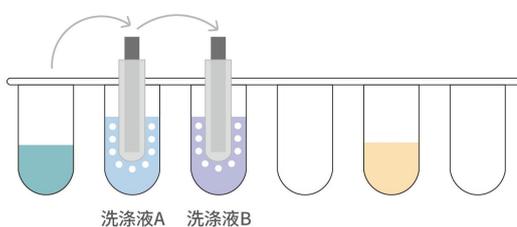
### ① 样品消化



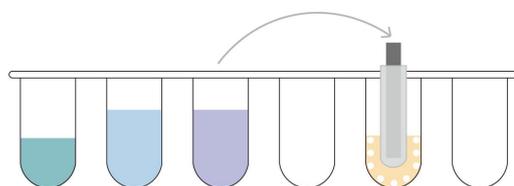
### ② DNA结合



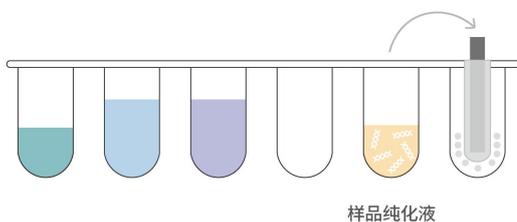
### ③ DNA洗涤



### ④ DNA洗脱



### ⑤ 磁珠归位



### ⑥ PCR



### ◆ 提取准备

按照下述 96 深孔板排布预先加入相应溶液:

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1						PCS					
S2											
S3											
S4											
S5											
S6											
S7											
S8						NCS					
结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/
样品						样品					

其中:

第 1 或 7 列: 结合液 200  $\mu$ L/孔, 异丙醇 200  $\mu$ L/孔, 消化后的全部样品

第 2 或 8 列: 洗涤液 A 700  $\mu$ L/孔

第 3 或 9 列: 洗涤液 B 700  $\mu$ L/孔

第 4 或 10 列: 磁珠 50  $\mu$ L/孔

第 5 或 11 列: 洗脱液 65  $\mu$ L/孔

🔧 样品可在其他试剂全部加完后再加。

### ◆ 程序启动

1. 电源键打开—点击“登录”输入账号及密码—进入主界面。

2. 75%酒精棉球擦拭仪器内壁—点击“紫外灯”—选择“15 分钟”。

🔧 此步骤可在提取准备操作之前进行。

3. 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置, 并把塑料套管插入磁头

对应位置。

4. 点击“运行”—选择“Myco-601”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行。
5. 程序结束,发出“嘀嘀”声,立即取出深孔板,将样品纯化液全部转移到新的离心管内。

## 注意要点

1. 建议将实验室内部进行分区,分为阴性区(阴性对照样品处理、PCR试剂的配制、阴性模板加样)、阳性区(样品操作)、扩增区等,做好明显的标识。每个区域配备独立的设备、试剂及耗材,不得交叉使用。实验试剂、待测样品、PCR产物应分开存放,不应放于同处。减少在实验区内不必要的走动,以降低污染发生概率。
2. 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 °C。
3. 实验过程中选择最合适尺寸的手套并及时更换,在不同实验区域或进行模板操作后都应更换实验服、口罩、帽子及手套,以避免不同实验区域交叉污染。
4. 装有试剂的离心管在打开之前应先瞬时离心,将管壁及管盖上的液体离至管底,降低污染手套或移液枪的风险;谨慎开关反应管,防止管内液体溅出或形成气溶胶导致污染。
5. 使用过的枪头及废液必须经过消毒液浸泡消毒后,在远离实验室的场所丢弃或统一处理。
6. PCR 扩增完成后,需戴上一一次性手套将 PCR 管取出,观察管盖是否紧闭,管壁有否破裂,确保产物没有外漏,之后丢弃在指定处,严禁开盖。
7. 在磁性分离架上分离磁珠时,过程中可缓慢旋转离心管,加速磁珠聚集。
8. DNA 洗涤和洗脱操作时,每次振荡混匀后,都应该瞬时离心,以保证没有磁珠或液体附着于离心管盖或管壁上。
9. 在去除乙醇干燥时,观察磁珠状态,勿让磁珠太干,以免洗脱时不完全溶解。
10. 请尽量在完成样品纯化处理当天进行后续的 DNA 检测,以保证检测结果的准确性。
11. rHCDpurify 程序启动前,检查 96 深孔板和套管是否固定好。
12. rHCDpurify 仪器工作前及完成后需要紫外灭菌至少 15 分钟,并使用 75%酒精棉球将仪器内壁擦拭干净。且两次提取实验间隔至少为 30 分钟。
13. rHCDpurify 程序运行完毕后,需立即取出 96 深孔板并将洗脱液转移至新的离心管。96 深孔板第 5 或第 11 列壁上可能会出现冷凝水珠,该现象不会影响提取效果,只需将底部洗脱液转移出来即可,且保证多于 40  $\mu\text{L}$ ,确保检测时所需。

修订日期：2023 年 05 月 16 日

生效日期：2023 年 06 月 01 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话：0572-2165910