

支原体 DNA 提取纯化试剂盒 (磁珠法) (快速版) 说明书

货号：1509102

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/0

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®支原体 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）（快速版）用于快速高效提取纯化生物样品中的微量支原体 DNA，适用于原辅料、主细胞库、工作细胞库等细胞培养物以及生产工艺过程中各类基质样品下微量支原体 DNA 的快速提取，与 MycoSHENTEK®支原体 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）（快速版）配套使用，检测限可达 10 CFU/mL。

对于样品体积小于 150 μ L 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 150 μ L，再使用本试剂盒进行支原体 DNA 提取纯化。

本试剂盒可以手动操作，也可以通过 rHCDpurify®实现样品的自动化处理。

■ 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	洗涤液 A	NND015	15 mL \times 1 瓶	室温
	裂解&结合液	NND080	10 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
	蛋白酶 K 缓冲液	NND025	5 mL \times 1 瓶	室温
II	样品处理液	NND002	1.25 mL \times 4 管	2-8 $^{\circ}$ C
	磁珠	NND030	750 μ L \times 1 管	2-8 $^{\circ}$ C
	盐离子缓冲液	NND067	500 μ L \times 1 管	2-8 $^{\circ}$ C
III	助沉剂I	NND003	25 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C及以下
	助沉剂II	NND004	500 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C及以下
	蛋白酶 K	NND023	500 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C及以下

■ 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

- 无菌超纯水
- 无水乙醇（分析纯）
- 100%异丙醇（分析纯）
- PCR 八联管或 96 孔板，相应管盖或覆膜
- 1000 μL ，100 μL ，10 μL 无菌低吸附滤芯枪头
- 1.5 mL，2.0 mL 或 50 mL 无菌低吸附离心管
- 支原体阳性对照品，联系本公司订购

■ 相关设备

- 迷你离心机
- 磁性分离架或 rHCDpurify®
- 高速冷冻离心机
- 漩涡振荡器
- 恒温金属浴
- 1000 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪
- 荧光定量 PCR 仪
- 生物安全柜或洁净工作台
- 八联管或 96 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无菌超纯水配制 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)。
- 将 Fast MyInternal Control(IC)冻干粉 16000×g 离心 2 分钟, 加入 600 μL DNA 稀释液。振荡混匀后快速离心, 该操作重复三次。

备注: Fast MyInternal Control (IC) 和 DNA 稀释液为支原体 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) (快速版) 成分。

每次实验前需预先完成以下工作:

- 准备好 100%的异丙醇。
- 准备好金属浴温度, 72 °C (或 25 °C)、70 °C。
备注: 使用前若发现裂解&结合液出现结晶或沉淀, 应 37 °C金属浴处理, 待完全溶解后, 振荡混匀。
- 离心前需将离心机温度设置为 2-8 °C。
- 使用前应提前将磁珠置于室温环境下平衡 10 分钟, 使用前振荡均匀。
- 单个样品工作裂解&结合液的准备:

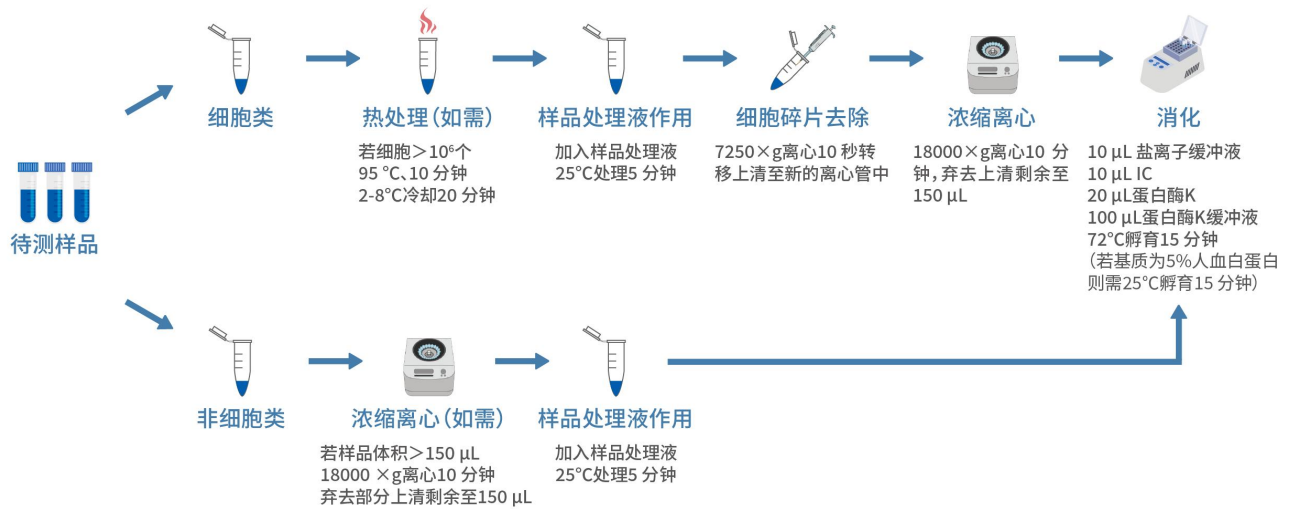
200 μL 裂解&结合液 + 5 μL 稀释后的助沉剂I + 9 μL 助沉剂II。

助沉剂I稀释: 根据使用体积将其用 DNA 稀释液稀释 100 倍。

备注: 按照上述单个样品的工作裂解&结合液用量和样品数, 计算和配制本次实验所需总量。

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:

◆ 细胞类样品

- 1) **样品处理液作用:** 加入样品处理液 (样品与处理液的体积比为 10 : 1), 涡旋振荡混匀, 25 °C处理 5 分钟。
- 2) **细胞碎片去除:** 7250×g 离心 10 秒; 离心后, 将上清转移至新的离心管中。
- 3) **浓缩离心:** 将转移后的上清, 18000×g 离心 10 分钟, 弃去上清剩余至 150 μL。
(若细胞 $>10^6$ 个, 则需在样品处理液作用前进行 95 °C、10 分钟热处理, 而后在 2-8 °C冷却 20 分钟。)

◆ 非细胞类样品

- 1) **浓缩离心:** 若样品体积 ≤ 150 μL, 则可不进行浓缩; 若样品体积 >150 μL, 则需 18000 ×g 离心 10 分钟, 弃去部分上清剩余至 150 μL。
- 2) **样品处理液作用:** 在浓缩后的样品中加入样品处理液 (样品与处理液的体积比为 10 : 1), 涡旋振荡混匀, 25 °C处理 5 分钟, 而后瞬时离心 3 秒。

◆ 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，加入样品处理液（样品与样品处理液的体积比为 10:1），涡旋振荡混匀，25 °C 处理 5 分钟，而后瞬时离心 3 秒。

➤ 阳性对照样品 (PCS)

取支原体阳性对照品，加入稀释液或样品基质（总体积可与待测样品体积保持一致），涡旋振荡混匀，瞬时离心 3 秒。加入样品处理液（样品与处理液的体积比为 10:1），涡旋振荡混匀，25 °C 处理 5 分钟，而后瞬时离心 3 秒。

注意：若加入样品基质需按照对应基质前处理方法进行操作。

三、样品消化

1. 在所有样品中，加入 10 μL 盐离子缓冲液、10 μL IC，涡旋振荡混匀，瞬时离心 3 秒。
2. 在所有样品中，加入 20 μL 蛋白酶 K、100 μL 蛋白酶 K 缓冲液，涡旋振荡混匀，瞬时离心 3 秒，然后 72 °C 孵育 15 分钟。

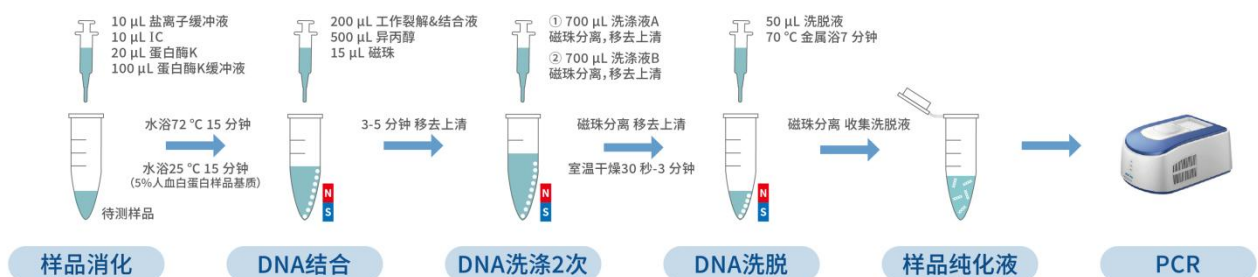
备注：若基质为 5% 人血白蛋白则需 25 °C 孵育 15 分钟。

为了使样品消化更加完全，可在孵育过程中再次进行涡旋振荡混匀后继续孵育。

注意样品预处理好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

1. 消化完成后, 加入 200 μL 工作裂解&结合液, 充分振荡混匀, 瞬时离心 3 秒。
2. 加入 500 μL 异丙醇, 充分振荡混匀, 瞬时离心 3 秒。
3. 加入 15 μL 磁珠, 置于漩涡振荡器上振荡 5 分钟, 快速离心使混合物甩至管底后, 静置于磁性分离架上。

备注: 如果样品较多, 每次加入磁珠过程中应再次充分振荡混匀, 以保证每次加入的磁珠量一致。

4. 待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头小心移去上清。

备注: 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

1. 向含有磁珠的离心管中加入 700 μL 洗涤液 A, 快速振荡混匀; 瞬时离心使混合物甩至管底后, 静置于磁性分离架上。待磁珠完全分离后, 移去上清液。
2. 向含有磁珠的离心管中加入 700 μL 洗涤液 B, 振荡 40 秒使磁珠和洗涤液 B 混匀; 瞬时离心使混合物甩至管底后, 静置于磁性分离架上。待磁珠完全分离后, 移去上清液。
3. 为保证液体充分移除, 可将离心管再次快速离心 10 秒, 待磁珠完全分离后, 用 10 μL 枪头小心的将残余液体吸除干净。
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, 以充分除去残留的乙醇。

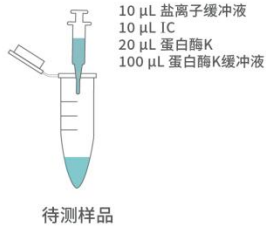
◆ 洗脱

1. 加入 50 μL 预热的洗脱液, 快速振荡混匀, 振荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。70 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 7 分钟, 金属浴过程中可再次振荡混匀 2-3 次。
2. 孵育完成后, 快速离心 1 分钟, 静置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 将溶液全部转移到干净的离心管中。

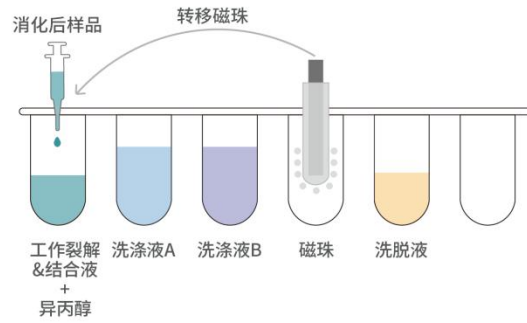
备注: 若离心管中有残留溶液, 可重复步骤 2。

(二) 操作过程 (rHCDpurify®前处理系统)

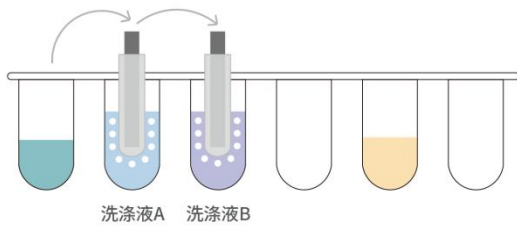
① 样品消化



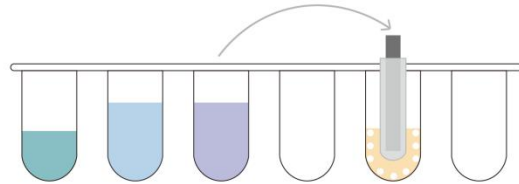
② DNA结合



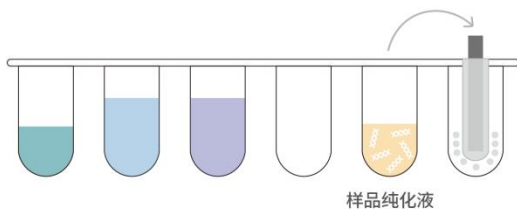
③ DNA洗涤



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					
工作裂解 & 结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	工作裂解 & 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: 工作裂解&结合液 200 μL/孔, 异丙醇 500 μL/孔, 消化后的全部样品

第 2 或 8 列: 洗涤液 A 700 μL/孔

第 3 或 9 列: 洗涤液 B 700 μL/孔

第 4 或 10 列: 磁珠 15 μL/孔

第 5 或 11 列: 洗脱液 65 μL/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“MycoFast_102”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行约 28 分钟。
5. 程序结束，发出“滴滴”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 μ L, 确保检测时所需。

生效日期: 2024 年 11 月 19 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号

Email: Info@shenkebio.com

电话: 400-878-2489