

支原体 DNA 提取纯化试剂盒（2G） （磁珠法）说明书

货号：1509840

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/2

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（2G）（磁珠法）用于提取纯化生物样品中的微量支原体 DNA，包括主细胞库、工作细胞库、病毒种子批等，同时对高浓度细胞（不大于 10⁷ 个）、高浓度质粒、5%人血白蛋白等复杂基质生物制品均适用，与 MycoSHENTEK® 支原体检测试剂盒（2G）（PCR-荧光探针法）配套使用，参照 EP 2.6.7 和 JP XVIII 支原体检测相关要求验证，检测限可达 10 CFU/mL。

对于样品体积小于 400 μL 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 400 μL，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×1 瓶	室温
	结合液	NND017	10 mL×1 瓶	室温
	洗脱液	NND019	5 mL×1 瓶	室温
	稀释液	NND022	5 mL×1 瓶	室温
	裂解液	NND028	5 mL×1 瓶	室温
II	样品处理液	NND002	1.25 mL×4 管	2~8 °C
	磁珠	NND033	750 μL×2 管	2~8 °C
	5M NaCl	NND040	500 μL×1 管	2~8 °C
III	助沉剂I	NND003	25 μL×1 管	-18 °C及以下
	助沉剂II	NND004	500 μL×1 管	-18 °C及以下
	蛋白酶 K	NND023	500 μL×2 管	-18 °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）。
- 将内部质控（IC）（2G）*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。

* 内部质控（IC）（2G）和 DNA 稀释液为支原体检测试剂盒（2G）（PCR-荧光探针法）试剂盒成分。

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，55 °C（或 25 °C）、70 °C。
 - 🔧 使用前若发现裂解液、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。
- 工作结合液配制：

单个样品工作结合液的准备：

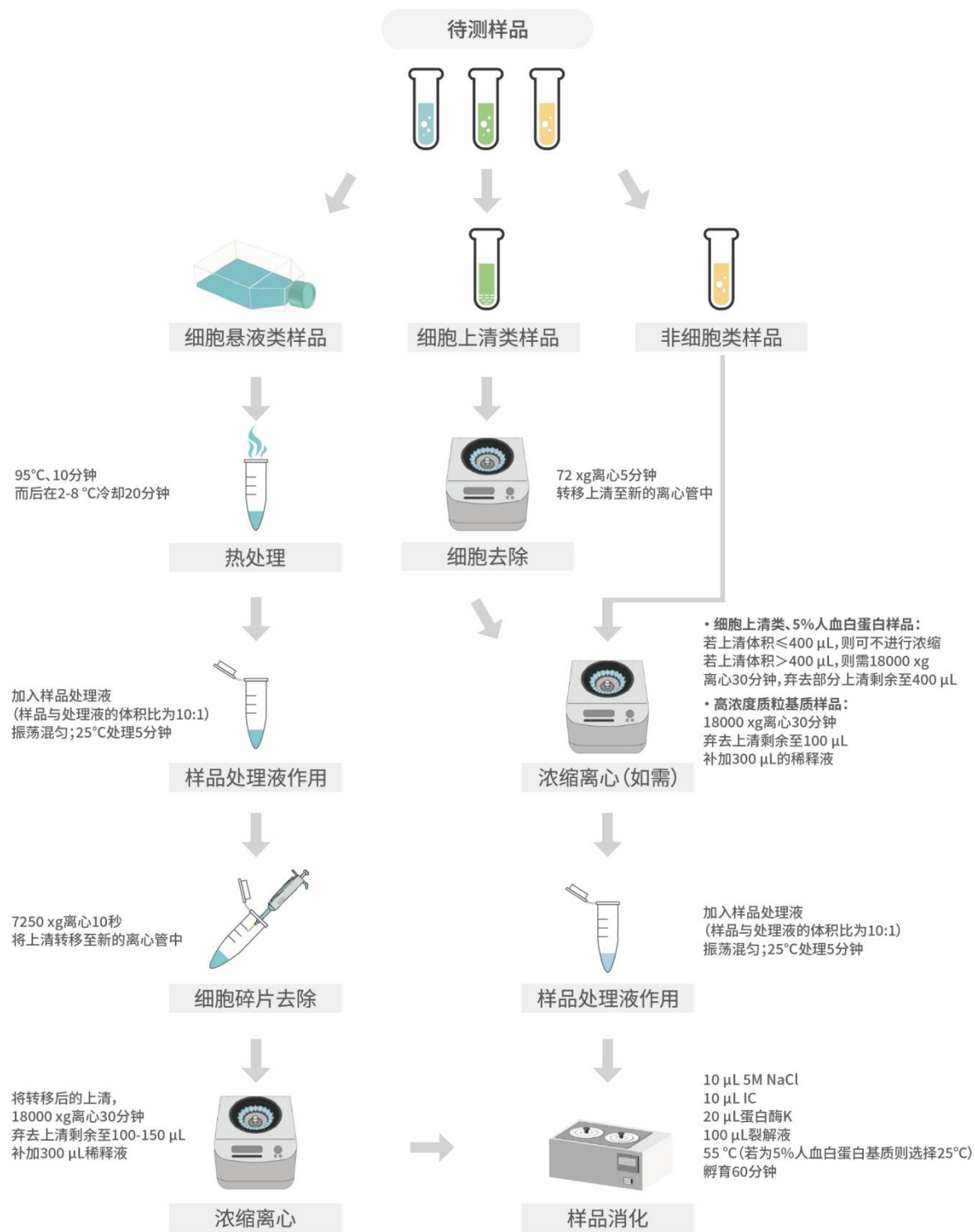
200 μL 结合液+5 μL 稀释后的助沉剂I+9 μL 助沉剂II。

助沉剂I稀释：根据使用体积将其用 DNA 稀释液稀释 100 倍。

- 🔧 按照上述单个样品的工作结合液用量和样品数，计算和配制本次实验所需的工作结合液总量。

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 (不大于 10^7 个)

- 1) **热处理:** 首先需进行 95 °C、10 分钟热处理, 而后在 2-8 °C 冷却 20 分钟。
- 2) **样品处理液作用:** 冷却后, 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。
- 3) **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。
- 4) **浓缩离心:** 将转移后的上清, 18000×g 离心 30 分钟; 从离心机中取出, 弃去上清剩余至 100-150 μ L; 补加 300 μ L 稀释液, 涡旋振荡混匀, 瞬时离心 3 秒。

◆ 非细胞类样品

✧ 高浓度质粒基质样品

- 1) **浓缩离心:** 18000×g 离心 30 分钟, 离心结束后从离心机中取出, 弃去上清剩余至 100 μ L; 补加 300 μ L 的稀释液。
- 2) **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, 而后瞬时离心 3 秒。

✧ 5%人血白蛋白基质样品

- 1) **浓缩离心:** 若样品体积 ≤ 400 μ L, 则可不进行浓缩; 若样品体积 > 400 μ L, 则需 18000 ×g 离心 30 分钟, 弃去部分上清剩余至 400 μ L。
- 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。

◆ 细胞上清

- 1) **细胞去除:** 72×g 离心 5 分钟, 沉淀细胞, 转移上清至新的离心管中。
- 2) **浓缩离心:** 若上清体积 ≤ 400 μ L, 则可不进行浓缩; 若上清体积 > 400 μ L, 则需 18000×g 离心 30 分钟, 弃去部分上清剩余至 400 μ L。
- 3) **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 100~400 μL **稀释液** (体积可与待测样品体积保持一致)。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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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

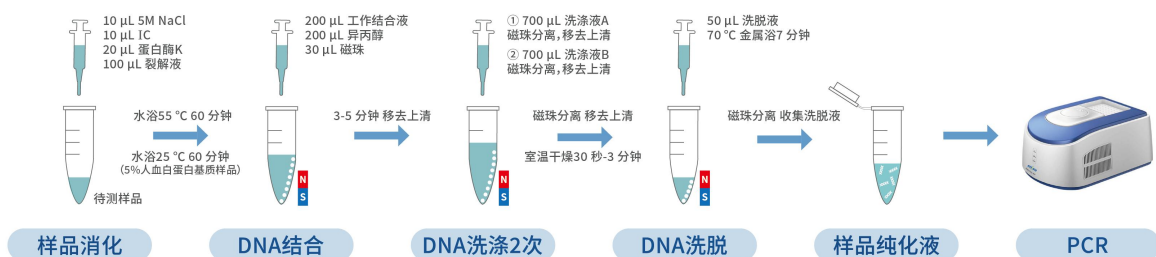
1. 在所有样品中, 加入 10 μL 5M NaCl、10 μL IC, 涡旋振荡混匀, 瞬时离心 3 秒。
2. 在所有样品中, 加入 20 μL 蛋白酶 K、100 μL 裂解液, 涡旋振荡混匀, 瞬时离心 3 秒, 然后 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟, 若基质为 5% 人血白蛋白则需 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟。

为了使样品消化更加完全, 可在孵育至 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. 将**磁珠**置于室温环境下 10 分钟, 振荡混匀。
2. 从金属浴中取出样品, 瞬时离心 3 秒, 加入 200 μL **工作结合液**, 振荡混匀, 瞬时离心 3 秒。

3. 向样品混合物中分别加入 200 μL 异丙醇, 30 μL 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一致。

4. 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, 离心 10 秒后静置于磁性分离架上。

 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。

5. 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

1. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 A, 振荡 10 秒使磁珠和洗涤液 A 混匀; 快速离心 10 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。

2. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 B, 振荡 40 秒使磁珠和洗涤液 B 混匀; 快速离心 10 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 10 秒, 置于磁性分离架上, 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。

 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。

 干燥时间依具体情况而定, 室温较高或空气干燥的环境下可以选择较短干燥时间; 而室温较低或空气湿润环境下, 干燥时间可以稍长。

◆ 洗脱

1. 沿离心管壁加入 50 μL 预热的洗脱液, 用漩涡振荡器轻微振荡 5 秒使磁珠和洗脱液混匀, 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。

 振荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。

 振荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新振荡混匀。

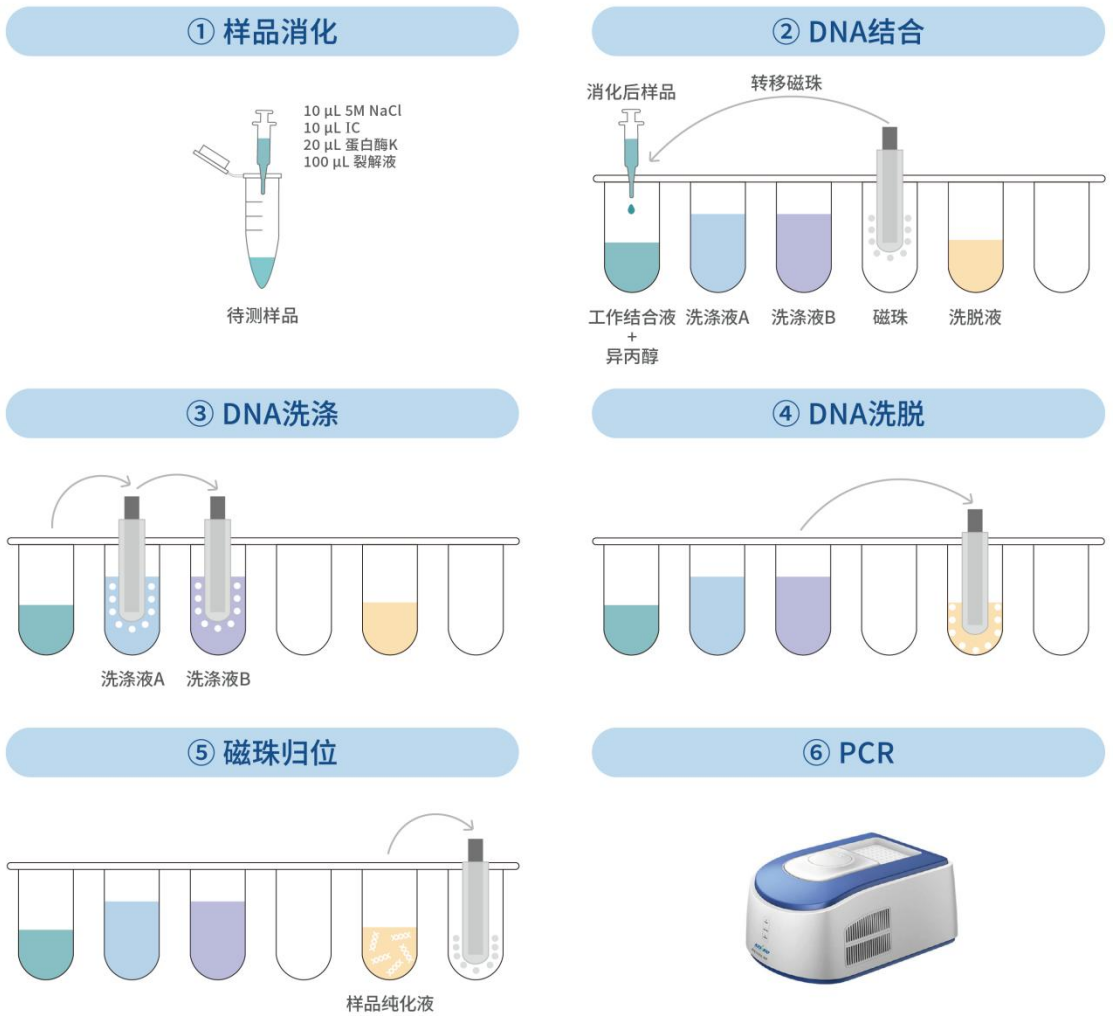
2. 孵育完成后, 将离心管快速离心 1 分钟, 然后静置于磁性分离架上, 待磁珠分离后, 用枪头小心转移溶液到干净的离心管中。

3. 将上一步获得的离心管快速离心 10 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，离心管内不得残留液体，否则将影响样品检测的准确性。

(二) 操作过程（rHCDpurify®前处理系统）



◆ 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					
工作结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	工作结合液 + 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：工作结合液 200 μL/孔，异丙醇 200 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 30 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“Myco-2G”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行约 43 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 μ L, 确保检测时所需。

修订日期: 2023 年 05 月 06 日

生效日期: 2023 年 05 月 12 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 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910