



Magbead Pathogenic Microbiome DNA/RNA Kit

磁珠法病原微生物DNA/RNA提取试剂盒

Cat. No. CW3061S

产品简介

本试剂盒适用于从痰液、肺泡灌洗液、血液、腹水等生物液体样本中纯化和富集病毒、细菌和真菌等病原微生物DNA及RNA。用本试剂盒纯化的微生物DNA及RNA适用于多种下游应用，包括PCR、RT-PCR、荧光定量PCR、NGS等各种下游实验。

保存条件: 室温 (10~30°C)

产品内容

Component	CW3061S 96 preps
Buffer LBS-A	20 mL
Buffer ML	25 mL
Buffer GW1	180 mL
Buffer GW2	180 mL
RNase-Free Water	10 mL
Proteinase K	4×1.25 mL
Magbeads PN	2×1.5 mL
Lysis Tubes II (96)	1

自备仪器、试剂

1. 2/15 mL磁力架或32通道核酸提取仪 (CWE3200/AE2100)
2. 96孔提取板及8联磁棒套
3. 异丙醇
4. PBS缓冲液

实验前准备及重要注意事项:

1. 使用前请检查Buffer LBS-A及Buffer ML是否出现沉淀, 如有沉淀出现, 请置于56°C水浴重新溶解。
2. 本试剂盒旨在从完整的微生物细胞中分离DNA及RNA, 为了保证微生物DNA及RNA的最佳回收效率, 样品应保证新鲜, 并避免反复冻融。如果需要短期储存或运输, 最好在2~8°C条件下进行, 长期保存可置于-20°C或-80°C冷冻保存。
3. 为避免由于污染造成的错误结果, 请保持工作区域清洁和穿防护服, 并合理设置对照品进行质控。采用适当措施处理样品材料, 降低交叉污染的风险。提取过程中, 使用DNA/RNA-free的移液器吸头和消耗品, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 防止污染。使用全自动核酸提取仪前后, 建议使用75%乙醇擦拭并开启紫外照射。

样本前处理

1. 尿液、胸腹水、脑脊液等非粘稠体液样本
直接取400 μL 样本进行提取。
2. 拭子类样本 (如鼻、咽及肛拭子等)
湿拭子样本 (含保存液): 涡旋振荡混匀后, 直接取400 μL 进行提取。
干拭子样本: 将拭子棉签部分在0.5 mL PBS中旋转至少20 s, 取出棉签前将棉签在管壁上多次挤压, 使棉签内的菌液尽量挤出, 减少样本损失, 再取400 μL 进行提取。
3. 痰液
取约500 μL 样本, 加入2倍体积 (约1 mL) 的液化试剂Buffer GB1, 37°C, 600 rpm孵育15~30 min, 浓痰样本建议每隔5 min涡旋混匀一次至样本完全液化。取适量液化痰液样本至离心管中, 12,000 rpm离心5 min, 弃上清, 使用400 μL 痰液上清液重悬沉淀。
注意: 样本体积可适当增减, 并相应调整Buffer GB1的加入量, Buffer GB1本试剂盒不提供。稀痰样本可选10~15min, 浓痰样本建议30min, 视具体液化程度而定。
4. 肺泡灌洗液
澄清样本: 无需液化, 直接取400 μL 样本进行提取。
含有少量粘稠痰液样本: 将尽量多的肺泡灌洗液样本先进行离心, 留取下层粘稠部分 (含痰液、细胞、菌体) 参照痰液样本进行液化处理, 取400 μL 样本上清液重悬沉淀。

5. 血液

血清、血浆可直接取400 μL 进行提取;

少量全血样本 (少于200 μL) 使用PBS补足至400 μL 后进行提取;

大体积全血样本推荐使用红细胞裂解液 (CW0613) 处理后再进行提取。

6. 微生物培养物样本

细菌($\leq 1 \times 10^9$ 个细胞), 真菌($\leq 1 \times 10^9$ 个细胞)。

操作步骤

一. 手动操作

1. 向Lysis Tubes II 中加入400 μL 样本和200 μL Buffer LBS-A, 20 μL Proteinase K, 涡旋混匀, 采用以下任意一种震荡方式处理:
 - 1.1 将Lysis Tubes II置于室温涡旋振荡10 min;
 - 1.2 将Lysis Tubes II置于恒温混匀仪上65°C, 2500 rpm处理10 min(无法设置温度时可以不加热);
 - 1.3 将Lysis Tubes II置于样本匀质仪中, 可根据不同品牌的仪器选择合适的程序进行裂解: 如使用MP公司FastPrep-24-5G (6 M/S的速度振荡30 sec, 间隔30 sec, 共6个循环)。
2. 向振荡后的Lysis Tubes II中加入250 μL Buffer ML, 20 μL Proteinase K, 涡旋混匀, 置于56°C水浴锅中孵育10 min, 或放入恒温混匀仪上56°C, 0 rpm孵育10 min, 室温12000 rpm离心1 min, 转移所有上清至新的离心管中。
3. 在离心管中加入400 μL 异丙醇, 涡旋混匀, 瞬时离心1-3秒以收集管盖内壁上的液体。
4. 向离心管中加入30 μL Magbeads PN (加样前充分混匀), 涡旋混匀, 将离心管置于恒温混匀仪上, 1500rpm混匀3 min, 静置1 min, 瞬时离心1-3秒, 将离心管置于磁力架上, 静置1 min, 用移液器小心吸弃所有上清。
5. 从磁力架上取下离心管, 在离心管中加入800 μL Buffer GW1, 室温涡旋1 min (或恒温混匀仪2500 rpm混匀1 min, 下同), 静置1 min, 瞬时离心1-3秒, 将离心管置于磁力架静置1 min或至磁珠完全吸附, 用移液器小心吸弃所有上清。
6. 重复上一步骤5操作一次。
7. 从磁力架上取下离心管, 在离心管中加入800 μL Buffer GW2, 室温涡旋1 min, 静置1 min, 瞬时离心1-3秒, 将离心管置于磁力架上静置1 min或至磁珠完全吸附, 用移液器小心吸弃所有上清。
8. 重复上一步骤7操作一次。
9. 开盖晾干至磁珠表面无光泽呈哑光状态 (3 min左右), 加入70 μL RNase-Free-Water, 涡旋混匀1 min, 瞬时离心1-3秒, 将离心管置于磁力架上, 静置3-5 min至磁珠完全吸附。
10. 吸取洗脱产物至新的1.5 mL新离心管中, 洗脱产物可直接用于下游实验或于-20°C长期保存。

二. 与核酸提取仪CWE3200/AE2100匹配

1. 向Lysis Tubes II 中加入400 μL 样本和200 μL Buffer LBS-A, 20 μL Proteinase K, 涡旋混匀, 振荡方法同手动操作步骤1, 室温12000 rpm离心1min。
2. 按照下表在96深孔板中分装试剂

位置	试剂	体积
第 1、7 列	Buffer ML	200 μL
第 1、7 列	异丙醇	350 μL
第 2、8 列	Buffer GW1	800 μL
第 3、9 列	Buffer GW1	800 μL
第 4、10 列	Buffer GW2	800 μL
第 5、11列	Buffer GW2	800 μL
第 3、9 列	Magbeads PN	30 μL
第 6、12 列	RNase-Free Water	70 μL

3. 在分装好试剂的96深孔板第1、7列中加入步骤1中所有上清样本 (约480-500 μL), 20 μL Proteinase K。
4. 按照下表编辑并运行提取程序:

步骤	磁棒位置	步骤名称	温度	释放磁珠	搅拌速度	时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
1	1	裂解	56°C	否	慢速	10min	1	0	0
2	3	收集磁珠	0	否	快速	5s	1	2	30s
3	1	结合	0	是	中速	5min	1	2	10s
4	2	漂洗1	0	是	快速	2min	1	2	10s
5	3	漂洗2	0	是	快速	2min	1	2	10s
6	4	漂洗3	0	是	快速	2min	1	2	10s
7	5	漂洗4	0	是	快速	2min	1	2	10s
8	5	干燥	0			5min			
9	6	洗脱	56°C	是	快速	3min	1	0	0
10	6	静置	0			3min			
11	6	收集磁珠	0	否	快速	5s	1	2	30s
12	2	释放磁珠	0	是	快速	5s	1	0	0