



Pathogenic Microbiome DNA Kit

病原微生物基因组DNA提取试剂盒

目录号：CW3030S（50 preps）

保存条件：Box I 于室温（15-30℃）保存，Box II 于 -20℃ 保存。

产品内容

Box I：

Component	CW3030S 50 preps
Buffer GL	15 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer GE	15 ml
Enzymatic Lysis Buffer	10 ml
Proteinase K Storage Buffer	1.25 ml
Lysis Tubes	50
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

Box II：

Component	CW3030S 50 preps
Buffer GB1	2×20 ml
Buffer GB2	4×25 ml
Benzonase (250 U/μl)	100 μl
Lysozyme	100 mg
Proteinase K	25 mg

产品简介

本试剂盒是进行微生物组分析的专用样品制备解决方案，适用于从拭子、血液、痰液、肺泡灌洗液等混合样本中纯化和富集细菌、真菌等病原微生物基因组DNA。本试剂盒在纯化过程中，通过差异性裂解宿主细胞以及后续的酶消化，能在有效去除绝大部分宿主DNA的同时，最大程度全面覆盖细菌、真菌等病原微生物DNA位点，获得具有更高覆盖度的微生物组DNA富集产物。用本试剂盒纯化的微生物DNA适用于多种下游应用，包括全基因组测序分析、基于16S rDNA的高灵敏度微生物组分析、以及宏基因组鸟枪法测序分析。

自备试剂及耗材

带有气溶胶屏障的无菌移液器吸头，可防止交叉污染

无水乙醇

微量离心管（2 ml/1.5 ml）

PBS缓冲液（仅某些样品需要）

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入1.25 ml Proteinase K Storage Buffer，-20℃保存。配制好的Proteinase K（20 mg/ml）勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 将Lysozyme（100 mg）干粉加入10 ml Enzymatic Lysis Buffer中使其溶解，终浓度为10 mg/ml，分装到无菌管中，-20℃保存。配制好的Lysozyme（10 mg/ml）勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
3. 使用前在室温或2–8℃下解冻Buffer GB1和Buffer GB2，并充分混匀。解冻后的Buffer GB1和Buffer GB2可以于2–8℃放置1-2周而不影响其活性，长期保存应于-20℃。为了确保最佳性能，冻融不要超过3次。如果一次提取需要的Buffer GB1和Buffer GB2不足一瓶，请确保在超净工作台等无菌条件下使用，并避免剩余缓冲液中微生物的污染和生长。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇，并做好标记。
5. 使用前请检查Buffer GL是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀出现，请将Buffer GL于56℃水浴重新溶解。
6. 如果下游实验对RNA污染比较敏感，可以在加入Buffer GL前加入4 μl DNase-Free的RNase A（100 mg/ml），RNase A本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0601S。

7. 本试剂盒旨在从完整的微生物细胞中分离DNA，为了保证微生物DNA的最佳回收效率，样品应保证新鲜。如果需要储存或运输，最好在2–8°C条件下进行，不可冻融，冻融会损坏微生物细胞的完整性，因此在去宿主DNA时会导致暴露的微生物DNA损失。
8. 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-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。

操作步骤

1. 样本前处理：

1a: 对于拭子样品，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。

1b: 对于粘稠的样本，如痰液等，取约500 μ l样本，加入1.5倍体积（约750 μ l）的Buffer GB1，37°C，600 rpm孵育15-30 min，至样本完全液化。

注意：样本体积可以适当增减，并相应调整Buffer GB1的加入量。

1c: 对于含有少量粘稠痰液的肺泡灌洗液，将尽量多的肺泡灌洗液样本先进行离心，小心去除上清，留取下层粘稠部分（含痰液、细胞、菌体），加入1.5倍体积的Buffer GB1，37°C，600 rpm孵育15-30 min，至样本完全液化。

1d: 对于血液、脑脊液等非粘稠体液样本，不需要液化处理，直接取适量样本，进行步骤2的操作，离心收集细胞沉淀。

2. 10000 rpm室温离心5-10 min，小心弃除上清。

注意：不要扰动下层细胞沉淀，以免造成样本损失。

3. 加入500 μ l Buffer GB2，涡旋混匀，室温，600 rpm孵育10 min。

4. 12000 rpm离心2 min，小心去除上清。

注意：去除上清时不要扰动菌体沉淀，以免造成样本损失。

5. 向沉淀中加入200 μ l Buffer GB2，加入2 μ l Benzonase，37°C，600 rpm孵育30 min。

6. 12000 rpm离心2 min，弃上清，加入500 μ l Buffer GB2，涡旋混匀，清洗沉淀。重复此步骤一次。

7. 12000 rpm离心2 min，弃上清，最后用小量程的枪头吸净残留的Buffer GB2。

8. 加入180 μ l Lysozyme (10 mg/ml)，重悬菌体沉淀，并将菌体重悬液转移到Lysis Tube中。

9. 将Lysis Tube置于37°C，600 rpm孵育20-30 min，然后涡旋10 min或者于恒温混匀仪上以最大振速（2500-2900 rpm）处理10 min。

10. 短暂离心，加入20 μ l proteinase K，涡旋混匀，加入200 μ l buffer GL，涡旋混匀，56 $^{\circ}$ C，600 rpm孵育30 min。
注意：1) 不要把**Proteinase K**直接加到**Buffer GL**中。
2) 如需去除RNA，在加入**Buffer GL**前加入4 μ l DNase-Free的 **RNase A** (100 mg/ml) (货号：**CW0601S**)，震荡混匀，室温放置**5-10**分钟。
11. 12000 rpm离心1 min，小心吸取上清至新的离心管中。
注意：不要吸取到玻璃珠。
12. 加入200 μ l无水乙醇，涡旋混匀，瞬时离心使溶液收集至管底。
注意：加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。
13. 将步骤12所得溶液（包括形成的沉淀）全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM），若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
14. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
15. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤15一次。
16. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，彻底晾干。
注意：这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应（酶切、PCR等）。
17. 将吸附柱置于一个新离心管（自备）中，向吸附柱中间部位悬空加入50 μ l Buffer GE，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。
注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。
2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。
3) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤17所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤17。
4) 保存在水中的DNA会受到酸性水解作用影响，如需长期保存，推荐用Buffer GE洗脱并于-20 $^{\circ}$ C保存。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途