

微生物基因组 DNA 提取试剂盒（磁珠法）使用说明书

【预期用途】

微生物基因组 DNA 提取试剂盒（磁珠法）用于从革兰氏阳性细菌或真菌等含细胞壁的生物体中分离纯化出高质量、高浓度的基因组 DNA。

【检验原理】

在高速振荡情况下，玻璃珠破坏微生物细胞壁。在裂解吸附液和蛋白酶 K 的作用下微生物基因组 DNA 与蛋白质分离，在裂解吸附液高盐低 pH 的环境下，磁珠表面的硅胶高效吸附分离的 DNA；洗涤磁珠，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶释放吸附的 DNA，从而达到快速分离纯化基因组 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-MD02-01	消化液	2mL×1 支	4mL×1 瓶	8mL×1 瓶
	研磨管	50 支	100 支	200 支
	裂解吸附液 D	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	RNA 清除剂	750μL×1 支	1.5mL×1 支	3mL×1 支
	蛋白酶 K	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 支
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	磁珠	500μL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 支
	洗脱液 B	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

蛋白酶 K：常温（10-30℃）运输，-20℃保存；

消化液\RNA 清除剂和磁珠：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】 使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 提前配制消化缓冲液。
4. 磁珠使用前必须充分混匀，磁珠不均匀容易导致磁珠吸取量不准确，从而影响提取效率。
5. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
6. 洗脱液使用量太少会影响提取效果。
7. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
8. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜的痰液、脓液、宫颈粘液、血清、血浆、乳液、粪便、尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、各种拭子（宫颈刷）、培养物等。

【适用范围】

$\leq 2.0 \times 10^9$ 个细菌； $\leq 5.0 \times 10^7$ 个真菌

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12000 \times g$ ）、振荡仪、恒温振荡金属浴或金属浴、2mL 磁力架、1.5mL 离心管、生理盐水、无水乙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- **消化缓冲液配制：**使用前每 1mL 生理盐水中加入 40 μ L 的消化液，配制成消化缓冲液。即用即配。

【样本处理】

1 痰液、脓液、宫颈粘液、粘液型粪便等样本

1.1 在痰液（脓液、宫颈粘液或粘液型粪便）中加入 5 倍体积的消化缓冲液，室温充分振荡，使粘液完全液化。

1.2 取一定量液化后的样本， $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

1.3 在沉淀中加入 $500\mu\text{L}$ 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

1.4 在沉淀中加入 $15\mu\text{L}$ RNA 清除剂和 $200\mu\text{L}$ 生理盐水，充分悬浮沉淀，转移悬浮的沉淀至研磨管中。

1.5 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（ 25°C ） $3,000\text{rpm}$ 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 70。

►研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加/减少运行次数和频率等。

1.6 取出研磨管，瞬时离心。 42°C 孵育 5 分钟。

2 血清、血浆、乳液等样本

2.1 在研磨管中加入 $15\mu\text{L}$ RNA 清除剂和 $200\mu\text{L}$ 血清（血浆、乳液）。

2.2 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（ 25°C ） $3,000\text{rpm}$ 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 65。

►研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加/减少运行次数和频率等。

2.3 取出研磨管，瞬时离心。 42°C 孵育 5 分钟。

3 粪便样本

3.1 在研磨管中加入 20mg 粪便(黄豆大小)、15 μ L RNA 清除剂和 200 μ L 生理盐水,充分搅匀。

3.2 将研磨管放入振荡仪或研磨仪,振荡仪的程序为:室温(25 $^{\circ}$ C) 3,000rpm 振荡 10 分钟;研磨仪(以上海净信研磨仪为例)的程序为:运行 90 秒,中断 5 秒,运行 5 次,频率 65。

►研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调,如增加/减少运行次数和频率等。

3.3 取出研磨管,瞬时离心。42 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。

4 尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液、组织渗出液、水样粪便等样本

4.1 取一定量的样本,12,000 $\times$ g 离心 2 分钟。吸弃上清,保留沉淀。

4.2 在沉淀中加入 500 μ L 生理盐水,充分悬浮沉淀。12,000 $\times$ g 离心 1 分钟,弃上清,保留沉淀。

4.3 在沉淀中加入 15 μ L RNA 清除剂和 200 μ L 生理盐水,充分悬浮沉淀,转移悬浮的沉淀至研磨管中。

4.4 将研磨管放入振荡仪或研磨仪,振荡仪的程序为:室温(25 $^{\circ}$ C) 3,000rpm 振荡 10 分钟;研磨仪(以上海净信研磨仪为例)的程序为:运行 90 秒,中断 5 秒,运行 5 次,频率 65。

►研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调,如增加/减少运行次数和频率等。

4.5 取出研磨管,瞬时离心。42 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。

5 其他样本

5.1 各种拭子（宫颈刷）：将拭子（宫颈刷）在生理盐水中振荡 20 秒。取 1mL 振荡后的生理盐水加入至 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5.2 液体培养的样本：在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的细菌（真菌）悬液（或者已计数的菌液）， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5.3 固体培养的样本：用接种环刮取一定量的细菌（真菌），加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中，充分混匀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5.4 在沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

5.5 在沉淀中加入 15 μ L RNA 清除剂和 200 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀，转移悬浮的沉淀至研磨管中。

5.6 将研磨管放入振荡仪或研磨仪，振荡仪的程序为：室温（25 $^{\circ}$ C）3,000rpm 振荡 10 分钟；研磨仪（以上海净信研磨仪为例）的程序为：运行 90 秒，中断 5 秒，运行 5 次，频率 65。

►研磨仪的程序需要根据微生物的种类和研磨仪的品牌不同而微调，如增加减少运行次数和频率等。

5.7 取出研磨管，瞬时离心。42 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。

►本试剂盒提取某些微生物 DNA 时可能会有少量 RNA 残留，如果对 RNA 残留无特殊要求，可以省略“42 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟”这一步。

►用 500 μ L 生理盐水再次洗涤沉淀 1 次可以有效的去除样本中的干扰物，如果对 DNA 纯度无特殊要求，可以省略“在沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。”这一步。

6 其他样本（液氮研磨法）

6.1 按步骤 5.1-5.3 收集一定量的革兰氏阳性细菌（真菌）沉淀。

6.2 在沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

►用生理盐水洗涤 1 次沉淀能有效去除样本中的干扰物质，较好改善 260/280 以及 260/230 数据。

►如果对 260/280 以及 260/230 的数据没有更高的要求可以省略该步骤直接进入步骤 6.3。

6.3 用 50 μ L 生理盐水悬浮细菌（真菌），转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。将粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。

6.4 加入 15 μ L RNA 清除剂和 200 μ L 生理盐水，充分悬浮粉末。42 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。

【操作步骤】

1. 在含已处理样本的研磨管（离心管）中，加入 200 μ L 裂解吸附液 D 和 20 μ L 蛋白酶 K，吹打混匀。闭盖 60 $^{\circ}$ C 静置 10 分钟。

2. 取出研磨管，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，吸取 400 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中。

►取出研磨管后必须离心取上清至新的 1.5mL 离心管中，否则严重影响提取效率。

3. 取出离心管，开盖，加入 280 μ L 异丙醇和 10 μ L 混匀的磁珠。闭盖，室温 3000rpm 振荡 30 秒。

►磁珠使用前必须充分混匀。

4. 取出离心管，瞬时离心。将离心管放于磁力架上，吸附磁珠 3 分钟。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

►由于各个实验室磁力架磁力不尽相同，吸附时间可以根据具体实验情况调整。

5. 加入 600 μ L RAW1，闭盖。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

6. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

►吸附磁珠务必至液体清澈。

7. 加入 600 μ L 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

8. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

►吸附磁珠务必至液体清澈。

9. 加入 600 μ L 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在乙醇水溶液中。转移 80%乙醇水溶液中的磁珠至新的 1.5mL 离心管中。

►务必将 80%乙醇水溶液中的磁珠转移至新的 1.5mL 离心管中，否则易导致离子残留过多。

10. 将新的离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

►磁吸附珠务必至液体清澈。

11. 将离心管放入离心机，闭盖瞬时离心 5 秒。

12. 将离心管放回 2mL 磁力架，开盖，吸弃残留液体。

13. 将离心管放入金属浴，开盖，50 $^{\circ}$ C 烘干 2 分钟。闭盖，取出离心管。

►样本较多时，取出离心管后必须闭盖，以防磁珠过度干燥，影响洗脱效果。

14. 开盖，在离心管中加入 200 μ L 洗脱液 B，充分吹打混匀磁珠。闭盖，室温 1500rpm 振荡 3 分钟。

►洗脱液 B 的量可以根据需要调整，但洗脱液必须完全覆盖磁珠。

15. 将离心管放入磁力架上，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸取洗脱液转移至新的离心管中。洗脱液即可直接用于 PCR 反应，也可-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

►为了避免洗脱液中微量磁珠残留，洗脱液转移至新的离心管后，可以 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，以彻底去除磁珠。

►室温振荡洗脱后不能离心收集磁珠，离心会导致离心管中的残留物进入洗脱液，从而抑制后续实验。

【微生物基因组 DNA 提取（磁珠法）常见问题解答】		
常见问题	原因	解决方案
未提取到 DNA 或产量低	1.样本使用量过少	增加样本使用量,但使用量不超过 2.0×10^9 个细菌和 5.0×10^7 个真菌。
	2. 样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长,内源性 DNase 导致 DNA 降解。采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本。
	3. 细胞壁破坏不充分	增加研磨速度和时间。
	4.样本裂解不充分	蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K; 研磨时细胞壁破坏不充分, 增加研磨速度和时间。
	5.乙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入无水乙醇。
	6. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1, 使乙醇含量达 60%。
	7. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液, 使乙醇含量达 80%。
	8.洗脱不当	洗脱液加至膜中央, 适当减少洗脱体积, 可 65°C 预热、延长室温放置时间或者进行二次洗脱。
DNA 降解或断裂	1. 样本未及时保存或保存不当	采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本。
	2.样本反复冻融	避免样本反复冻融, 分装保存。
	3.使用 EDTA 以外的抗凝剂抗凝	其他抗凝剂可能加速 DNA 的降解。使用 EDTA 抗凝剂抗凝的样本, 对新样品重新纯化。
	4.研磨速度太快或时间太长。	降低研磨速度, 减少研磨时间
纯度低	1.盐离子残留	培养基残留, 使用生理盐水洗涤细菌 1 次; 第二次加入 80%乙醇洗涤后, 磁珠务必移至新的 1.5mL 离心管。
	2.蛋白残留	有些样本蛋白含量较高, 容易导致蛋白残留。减少样本使用量; 增加 1 次 RAW1 洗涤。
	3.乙醇残留	磁珠未完全干燥, 延长干燥时间。
RNA 残留	1.样本使用量过高	不同样本 RNA 含量相差大, 减少样本使用量, 使用量不超过 2.0×10^9 个细菌和 5.0×10^7 个真菌。
	2.样本处理时未加入 RNA 清除剂	按说明书正确加入 RNA 清除剂。

【说明书编制日期】2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称: 无锡迈德泰克生物医药有限公司
公司地址: 江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室
网 址: www.wuxi-medtech.com
联系电话: 173 1562 0564 (微信同号); 138 6175 7779 (微信同号)