

真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒 (磁珠法) 说明书

货号：1504633

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

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

MicroSHENTEK® 真菌&细菌 DNA 提取纯化试剂盒（磁珠法）用于提取纯化生物样品中的微量真菌&细菌 DNA，适用样品包括主细胞库、工作细胞库等细胞培养物，疫苗、细胞治疗产品等生物制品，同时对高浓度细胞（不大于 10^6 个细胞）类复杂基质生物制品均适用。该产品与 MicroSHENTEK® 细菌 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）和 MicroSHENTEK® 真菌 DNA 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）配套使用。试剂盒参照中国药典 qPCR 方法检测相关要求进行了验证，若使用推荐的体系提取性能可达 **50-100 CFU/管**，搭配对应检测试剂盒检测限不大于 **35 CFU/反应**。

本试剂盒通过 rHCD purify®前处理系统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	规格	储存条件
I	裂解液	NND046	2.5 mL × 2 瓶	室温
	结合液	NND047	5 mL × 2 瓶	室温
	洗涤液 A	NND048	7.5 mL × 2 瓶	室温
	洗脱液	NND049	2.5 mL × 2 瓶	室温
	稀释液	NND021	10 mL × 2 瓶	室温
	样品处理管	NND005	50 管	室温
II	5M NaCl	NND040	500 µL × 2 管	2-8 °C
	磁珠	NND033	750 µL × 2 管	2-8 °C
III	蛋白酶 K	NND023	500 µL × 2 管	-18 °C 及以下
	助沉剂I	NND003	25 µL × 2 管	-18 °C 及以下
	助沉剂II	NND004	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）
- 75%酒精
- 1000 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL 无菌低吸附滤芯枪头
- 1.5 mL，2.0 mL，50 mL 无菌低吸附离心管
- 真菌&细菌阳性菌株
- 医疗用一次性利器盒
- 核酸清除剂，联系本公司订购

■ 相关设备

- 真菌细菌破壁仪（Lyse-S）
- 单人桌面无菌超净工作台（SSD-1）
- rHCDpurify®前处理系统
- 迷你离心机
- 高速离心机
- 漩涡振荡器
- 恒温金属浴
- 1000 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

一、实验前准备

◆ 实验分区：

根据样品类型进行分区：分为阴性区、待测样品区、阳性区。

分别在各区域单人桌面无菌超净工作台（SSD-1）中操作。

阴性区

待测样品区

阳性区

阴性区：NCS 阴性质控处理加样区域&试剂加样区域；

待测样品区：待测样品处理加样区域；

阳性区：PCS 阳性质控处理加样区域。

◆ 环境控制：

工作区及环境进行适当地消毒，去除残留核酸。至少使用核酸清除剂、75%酒精进行全方位擦拭消毒处理各区域超净工作台。

打开超净工作台紫外灯灭菌，保证照射时长**不少于 1 小时**；并打开各区域紫外设施灭菌，保证照射时长**不少于 30 分钟**。

◆ 试剂准备：

注意：所有试剂稀释和加样均在阴性区操作！

- 根据使用体积将助沉剂I用稀释液按 10 倍梯度稀释 100 倍，备用。
- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 10 mL 的无水乙醇。
- 准备好 100%的异丙醇。
- 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）。
- 使用前若发现裂解液、结合液出现结晶或沉淀，应 37 °C 水浴，待完全溶解后，振荡混匀。
- 使用前应提前将磁珠置于室温环境下平衡 10 分钟，使用前涡旋振荡 10 秒混匀。

◆ 设备准备：

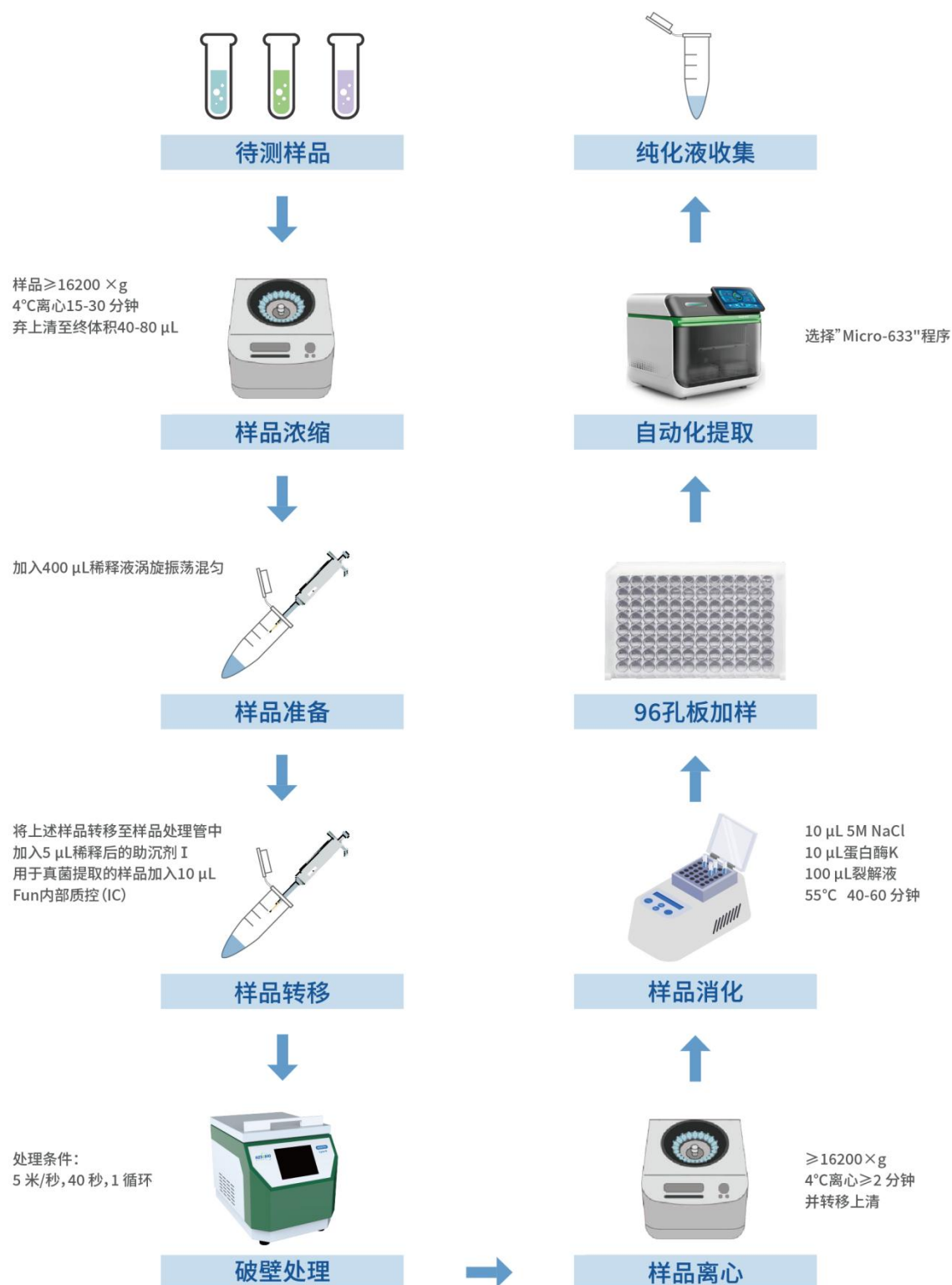
- 开启恒温金属浴，设置温度为 55 °C。
- 真菌细菌破壁仪：分别用核酸清除剂、75%酒精进行全方位擦拭消毒处理。
- 前处理提取仪：

电源键打开—点击“登录”输入账号及密码—进入主界面。

分别用核酸清除剂、75%酒精进行全方位擦拭消毒处理。处理后可提前插入塑料套管，紫外灭菌**不少于 1 小时**。

二、样品处理

◆ 待测样品处理操作流程如下：



*若用户样品为细胞基质，首先采用 $70-75 \times g$ ，5 分钟离心处理，离心后吸取上清按照上

述步骤操作。

其它基质样品可咨询湖州申科技术支持！

样品处理的详细步骤如下：

◆ 样品浓缩

1) 将样品等分为 2 份，1 份用于细菌提取，1 份用于真菌提取。分别采用 $\geq 16200 \times g$ ，4 °C 离心 15-30 分钟，使用移液器移去上清，使剩余体积为 40-80 μL ，后加入 400 μL 稀释液涡旋振荡混匀。

 离心时间的长短由样品初始体积决定，样品体积 $\geq 500 \mu\text{L}$ ，推荐使用 30 分钟离心。

◆ 样品准备

1) 将上述样品转移至样品处理管中。

2) 加入 5 μL 稀释后的**助沉剂I**。

3) 用于真菌提取的样品加入 10 μL Fun 内部质控 (IC) 。

 Fun 内部质控 (IC) 试剂为 MicroSHENTEK® 真菌 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 中组分。

◆ 破壁处理

1) 将样品处理管按照真菌细菌破壁仪 (Lyse-S) 说明书要求对称放置于仪器上，拧紧压盖螺母，关闭顶盖直至自动扣紧。

2) 选择自定义参数设置界面，根据提示设置速度、时间、循环数。推荐设置参数：**5 米/秒，40 秒，1 循环**条件下振荡处理。

◆ 样品离心

1) 将处理好的样品处理管于 $\geq 16200 \times g$ ，4 °C 离心 ≥ 2 分钟，确保离心后的管内液体全部离心到底部，液面位置无明显泡沫存在。

2) 离心后将样品上清液在对应操作区全部吸出，并转移至新的 1.5 mL 离心管(避免吸到底部白色颗粒)。

◆ 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**，按照上述样品处理步骤进行处理。

➤ 阳性对照样品 (PCS)

取真菌和细菌阳性菌株，分别加入稀释液或样品基质，推荐加入**待测样品**作为基质（总体积与待测样品体积保持一致），按照上述样品处理步骤进行处理。

三、样品消化

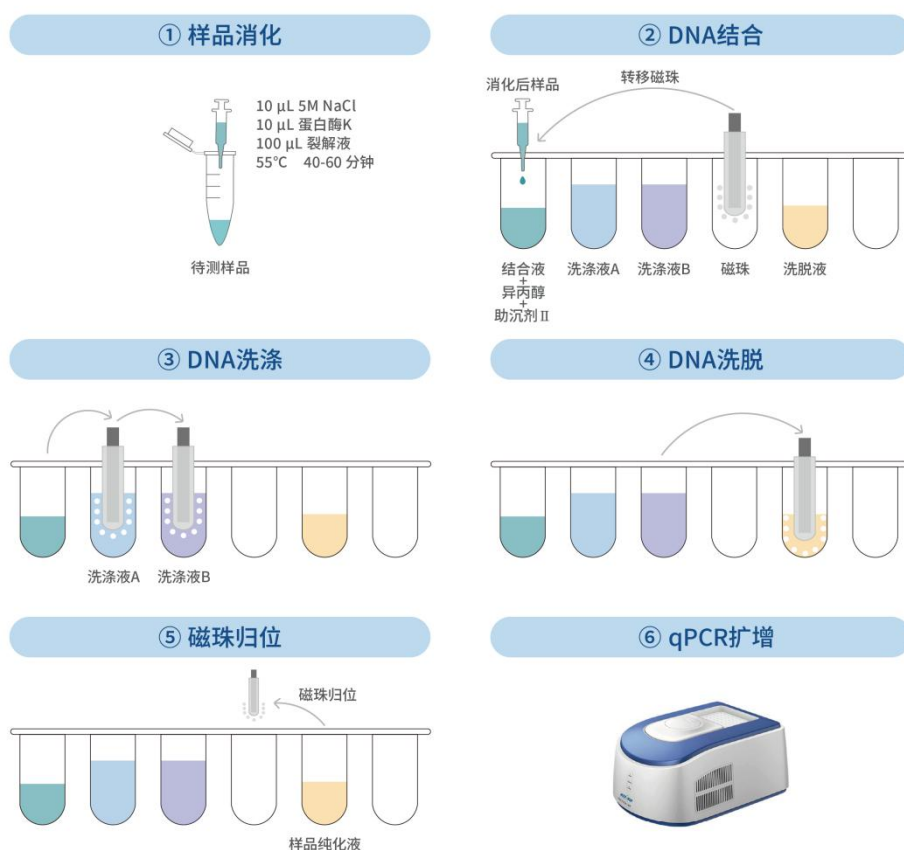
1. 在所有样品中，加入 10 μL **5M NaCl**、10 μL **蛋白酶 K**、100 μL **裂解液**，振荡混匀后，**55 °C**孵育 **40-60 分钟**。

为了使样品消化更加完全，推荐孵育至 **20-30 分钟**左右时再次进行涡旋振荡混匀后继续孵育。总孵育时长请根据样品及基质情况在推荐范围内确定。

注意样品消化后需尽快进行下述的 DNA 提取实验！

四、DNA 提取

操作过程 (rHCDpurify®前处理系统)



◆ 提取准备

预先准备两块 96 深孔板，并按照下述排布加入相应溶液：

待测样品和 NCS 排布示意图（96 深孔板-1）

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1- 细菌						NCS- 细菌					
S2- 细菌											
S3- 细菌											
S4- 细菌											
S1- 真菌											
S2- 真菌											
S3- 真菌											
S4- 真菌						NCS- 真菌					
结合液 + 异丙醇 + 助沉剂 II	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	结合液 + 异丙醇 + 助沉剂 II	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/
样品						样品					

PCS 排布示意图 (96 深孔板-2)

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCS- 细菌											
PCS- 真菌											
结合液 + 异丙醇 + 助沉剂 II	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液	/	/	/	/	/	/	/
样品											

其中：

第 1 或 7 列：结合液 200 μL /孔，异丙醇 200-400 μL /孔，助沉剂 II 9 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

✚ PCS 样品和其他样品推荐按照上述排布示意图分别置于两块 96 深孔板上进行提取。

✚ 上述待测样品、NCS 和 PCS 尾缀“-细菌”表示提取对应样品中的细菌；尾缀“-真菌”表示提取对应样品中的真菌。

◆ 程序启动

1. 将加好样的 96 深孔板快速放入仪器中固定位置（96 深孔板-1 放置仪器最右侧，96 深孔板-2 放置仪器最左侧），确认塑料套管已插入磁棒对应位置。
2. 点击“运行”—选择“**Micro-633**”程序—扫描试剂盒上二维码—仪器运行约 52 分钟。
3. 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化液按照样品类型全部转移到新的离心管内。

注意要点

1. 根据样品类型按照要求进行严格分区操作，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。
3. 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 °C，湿度不高于 70%。
4. 程序启动前，检查 96 深孔板和套管是否固定好。
5. 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。
6. 建议完成样品纯化处理当天进行后续的 qPCR 检测，确保检测结果准确。

生效日期：2024 年 02 月 06 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：400-878-2189