

MagPure Pathgen DNA Rich Kit

磁珠法病原 DNA 富集试剂盒

本产品适合于从血液、血清、血浆、拭子浸泡液、积液、匀浆液等样品提取病原总 DNA，产品基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品在裂解液、蛋白酶 K 和珠磨的作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和其它杂质，再经含乙醇洗涤去除盐分，最后 RNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测、二代测序等实验。

产 品 组 份

产品编号	R6674-01	R6674-02	R6674-03
纯化次数	48 次	96 次	480 次
匀浆管 F	48 次	96 次	480 次
Buffer SDS	5 ml	10 ml	30 ml
Buffer CLB2	20 ml	40 ml	200 ml
Proteinase K	24 mg	50 mg	220 mg
DNase I	10 mg	15 mg	60 mg
DNase Buffer	15 ml	30 ml	150 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
MagPure Particleds N9	2.5 ml	4 ml	16 ml
Buffer MLB	60 ml	120 ml	550 ml
Buffer MW1 *	22 ml	44 ml	176 ml
Buffer MW2 *	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer AVE	10 ml	20 ml	60 ml

保 存 条 件

本产品室温运输，长期保存时，把 Proteinase K、DNase I 保存于-20℃，MagPure Particles N9 保存于 2-8℃，其余产品保存于室温，有效期 18 个月。

产品组份

货号		试剂组份与装量	R6674-TL-06	R6674-S-48
2ml Beads Tubes F			96 次	48 次
Buffer SDS			10 ml	5 ml
Buffer CLB2			40 ml	20 ml
Proteinase K			50 mg	24 mg
Protease Dissolve Buffer			6 ml	6 ml
DNase I			10 mg	10 mg
DNase Buffer			30 ml	15 ml
DA-Tip			12 个	24 个
尖底板/ 试剂条	第 1/7 排孔: 500µl Buffer MLB		6 块	48 条
	第2/8排孔: 500µl Buffer MW1			
	第3/9排孔: 500µl Buffer MW1			
	第4/10排孔: 500µl Buffer MW2 30µl MagPure Particles N9			
	第5/11排孔: 500µl Buffer MW2			
	第6/12排孔: 70µl Buffer AVE			

保存条件

本产品室温运输，长期保存时，把 Proteinase K、DNase I 保存于-20℃，其余产品保存于室温，有效期 18 个月。

准备工作

- 溶解蛋白酶 K: 按标签所示加入蛋白酶溶解液，颠倒混匀，充分溶解后保存于-20℃。
- 溶解 DNase I(10mg/ml): 加入 1.0ml 蛋白酶溶解液至 DNase I 干粉中，混匀溶解后保存于-20℃。
- 使用前，洗涤液 MW1/MW2，按标签所示，加入适量的无水乙醇进行稀释。

第一部分：样品前处理流程

A: 病原总核酸提取（快速）

1. 转移 0.5~1.5 ml 的全血、血水、积液、血清、血浆、匀浆液、拭子浸泡液等体液样品至 2ml 离心管中，于 $500\sim 1,000 \times g$ 离心 10 分钟去除脱落细胞。
2. 转移 0.5ml 上清液至 1.5ml 离心管中，加入 10 μ l DNase I 和 25 μ l DNase Buffer，颠倒混匀，室温放置 20 分钟消化胞外核酸。
3. 加入 50 μ l Buffer SDS 和 20 μ l Proteinase K，颠倒混匀，室温放置 10 分钟灭活 DNase。
4. 转移全部消化液至匀浆管 F 中，盖紧盖子，转移至在涡旋仪上涡旋 10 分钟或转移至珠磨仪进行珠磨， $13,000 \times g$ 离心 3 分钟，按第二/三部分进行操作。
 - 涡旋仪：推荐使用涡旋仪 MagMix A，可一次高效处理 10~20 个样品。
 - PowerLyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
 - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
 - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
 - 净信研磨仪：4500~5000rpm，振荡 45s，间停 20s，重复 2 次，共振荡 3 次，时间共 135s。

B: 病原总核酸富集提取

1. 取 1.0~1.5ml 血浆、积液、全血、匀浆液、细胞悬液、拭子浸泡液等体液至 2ml 离心管中， $10,000 \times g$ 离心 5 分钟收集微生物，转移 250 μ l 上清液（含病原和支原体）至新的离心管中，用于病毒和支原体提取（第 5 步）。
2. 保留余下残液和沉淀，涡旋重悬沉淀，加入 0.25 倍体积的 Buffer CLB2 (~300 μ l) 和 3 μ l Proteinase K，颠倒混匀，室温放置 10 分钟。 $13,000 \times g$ 离心 10 分钟收集微生物细胞，小心吸弃上清液。
3. 加入 200 μ l DNase Buffer，涡旋重悬，加入 10 μ l DNase I，室温振荡 30 分钟消化 DNA。
4. 加入 50 μ l Buffer SDS 和 20 μ l Proteinase K，混匀，室温放置 10 分钟灭活 DNase。
5. 在 2ml 匀浆管 F 中，加入第 4 步的消化液和 250 μ l 病毒上清液（第 1 步），旋紧盖子，转移至涡旋仪上涡旋 10 分钟或珠磨仪上珠磨裂解微生物。 $13,000 \times g$ 离心 3 分钟，按第二/三部分进行操作。
若不需要病毒 DNA/RNA 时，可以加入 250 μ l 灭菌水代替病毒上清液。

第二部分：手工抽提流程

1. 转移 400~500 μ l 上清液（第一部分）至 2ml 离心管中，入 1ml Buffer MLB 和 30 μ l MagPure Particles N9，室温颠倒混匀 6 分钟，转移至磁力架上，静置 1 分钟吸附磁珠，吸弃溶液。
2. 加入 500 μ l Buffer MW1，涡旋混匀 5 秒。磁力架静置 1 分钟，小心吸弃所有溶液。

- 3. 加入 500µl Buffer MW1，涡旋混匀 5 秒。磁力架静置 1 分钟，小心吸弃所有溶液。
- 4. 加入 500µl Buffer MW2，涡旋混匀 5 秒。磁力架静置 1 分钟，小心吸弃所有溶液。
- 5. 加入 500µl Buffer MW2，涡旋混匀 5 秒。磁力架静置 1 分钟，小心吸弃所有溶液。
- 6. 短暂离心收集液滴，吸弃所有溶液，空气干燥 10 分钟。
- 7. 加 50~100µl Buffer AVE，室温振荡温育 10 分钟，磁力架静置 2 分钟，转移 DNA/RNA 溶液至新的 1.5ml 离心管中。

第三部分：32/48 通道核酸提取仪操作

- 1. 瓶装试剂：按预分装试剂表格所示，按各种试剂分装至 96 孔板的对应孔中。
预分装试剂：颠倒 96 孔板让磁珠充分悬浮，正放 1 分钟后，去除封口袋和封口膜。
- 2. 在第 1/7 排孔中，加入 200~250µl 上清液(第一部分)。
- 3. 把磁力外套插到仪器中，把 96 孔板放到仪器中(A1 孔按左内角放置)。编写程序，并启动对应程序。

序号	步骤名称	孔位	容积	混合时间		等待		磁吸时间			吸磁	加热	
				时间	速度	时间	位置	升降	液面	底部		板位	温度
1	吸磁	4	500	20s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
2	结合1	1	750	300s	8	0	0	90s	30	30	自动	/	/
3	清洗1	2	500	60s	8	0	0	90s	0	0	自动	/	/
4	清洗2	3	500	60s	8	0	0	90s	0	0	自动	/	/
5	清洗3	4	500	60s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
6	清洗4	5	500	60s	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
7	干燥	5	500	0	8	5	0	0	0	0	自动	/	/
8	洗脱	6	100	400s	9	0	0	60s	0	50	自动	/	/
9	弃磁	3	500	30s	9	0	0	0	0	0	自动	/	/

- 4. 约 30 分钟提取结束，取出 96 孔板和磁力外套。
- 5. 把 DNA/RNA 转移至 1.5ml 离心管中，把产物保存于-20~8℃。