

试剂盒1

【产品名称】

商品名称：磁珠法细胞/组织基因组提取试剂盒

【包装规格及适配仪器】

预分装：16T(适配 16通道全自动核酸提取仪)

预分装：96T(适配96通道全自动核酸提取仪)

非预分装：20T、100T、500T(手工提取和其他全自动核酸提取仪)

【预期用途】

用于核酸的提取、富集、纯化等步骤。其处理后的产物用于体外检测使用。产品组成中不含可与样本特异性结合的抗原、抗体、探针等成分。

【检验原理】

本试剂盒是基于生物纳米磁珠的核酸提取试剂盒，主要原理是利用功能性生物磁珠表面的功能基团，将核酸从样品裂解产物中富集至磁珠表面，再利用磁性分离装置对磁珠进行分离，从而快速分离纯化核酸。整个过程不需用到酚、氯仿等有机试剂，安全无毒，并且利用具有顺磁性的生物纳米磁珠，适合高通量自动化提取。

【主要组成成分】

货号	-16	-96	-20	-100	-500
规格	16 T 预分装	96 T 预分装	20 T 非预分装	100 T 非预分装	500 T 非预分装
裂解液	600 μ L/孔	65mL/96孔板*1板	13 mL	65 mL	325 mL
洗涤液 I	800 μ L/孔*2孔	96孔板*2板	36 mL	90 mL*2	450 mL*2
洗涤液 II	200 μ L/孔	96孔板*1板	5 mL	25 mL	125 mL
洗涤液III&磁珠	800 μ L/孔	96孔板*1板	18 mL	90mL	450 mL
洗脱液	100 μ L/孔	96孔板*1板	4 mL	20 mL	60 mL
蛋白酶K	800 μ L	2.0 mL*2	800 μ L	2.0 mL*2	2.0mL*10
组织前处理液(BC-6)	5mL/瓶	25mL/瓶	5mL/瓶	25mL/瓶	125mL/瓶
RNase A (10mg/mL) (选配)	480 μ L	1.2 mL*2	480 μ L	1.2 mL*2	1.2 mL*10
增强剂 (选配)	10mL/瓶	50mL/瓶	10mL/瓶	50mL/瓶	250mL/瓶

【储存条件及有效期】

室温(10-30 $^{\circ}$ C)保存，有效期12个月。

【样本要求及处理方法】

适用于细胞以及组织。

样本保存：1天以内提取需2-8 $^{\circ}$ C条件下贮存；1周以内提取需-20 $^{\circ}$ C条件下贮存；1周以上提取需在-80 $^{\circ}$ C条件下冻存，且避免反复冻融。

【自动提取（16通道设备以1和5通道加热为例）】

1、打开仪器电源，待仪器完成自检后，按对应的仪器型号设置参数。

表1. 16通道全自动核酸提取仪程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	6	1	2	3	4	6	5	6
等待时间	0	0	0	0	0	0	120s	0
混合模式	中速	中速	中速	中速	中速	中速	中速	中速
混合时间	30s	600s/900s ^a	240s/360s ^a	240s/360s ^a	120s/240s ^a	120s	480s	30s
吸磁时间	30s	120s	30s	30s	30s	30s	120s	0
体积(μ L)	800	800	800	800	200	800	100	800
温度	/	95℃	/	/	/	/	75℃	/

a: 为组织提取程序

表2. 96通道全自动核酸提取仪程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七	八
工位	5	1	2	3	4	5	6	5
等待时间	0	0	0	0	0	0	120s	0
混合模式	中速	中速	中速	中速	中速	中速	中速	中速
混合时间	30s	600s/900s ^a	240s/360s ^a	240s/360s ^a	120s/240s ^a	120s	480s	30s
吸磁时间	30s	120s	30s	30s	30s	30s	120s	0
体积(μ L)	800	800	800	800	200	800	100	800
温度	/	95℃	/	/	/	/	75℃	/

a: 为组织提取程序

2、(预分装试剂省略此步)非预分装试剂请预先将各组分(使用前务必充分摇匀)按照下表进行分装并做好标记。

组分	装量规格	96 T-工位	16 T-布板
裂解液	600 μ L/孔	工位1	1/7列
洗涤液I	800 μ L/孔	工位2	2/8列
洗涤液I	800 μ L/孔	工位3	3/9列
洗涤液II	200 μ L/孔	工位4	4/10列
洗涤液III&磁珠	800 μ L/孔	工位5	6/12列
洗脱液	100 μ L/孔	工位6	5/11列

细胞/组织样本

1、样本前处理

- (1) 羊水样本: 取3-5 mL样本至5 mL离心管中, 4000rpm离心5min, 去除上清, 加入200 μ L组织前处理液(BC-6), 用移液器吹打混匀。
- (2) 组织样本: 小鼠(心、肝、肺、肾、脑)推荐上样量为10 mg, 脾为5 mg。鱼卵、鱼肉、和猪耳朵推荐上样量20 mg, 组织适当剪碎后, 置于1.5 mL离心管中, 向离心管中加入200 μ L组织前处理液(BC-6), 40 μ L的蛋白酶K和一颗3mm氧化锆珠, 再用组织破碎仪破碎(推荐参数: 60Hz、运行45s, 研磨3次); 破碎完成后将离心管置于振荡混匀仪上, 65℃孵育30min, 猪耳需延长时间到60min, 直至组织块完全溶解后, 12000 rpm离心2 min, 转移上清进行实验。

- (3) 细胞：转移体积不超过200 μL ，总量不超过 5×10^6 个的细胞悬液至裂解液孔中（超过200 μL 体积的，需要4000rpm离心5min进行富集，贴壁细胞还需要先用胰酶进行脱壁，再按照悬浮细胞富集处理）。
 - (4) 鼠尾组织（快速）：在96孔深孔板中加入鼠尾样本（大鼠0.3 cm，小鼠0.6 cm，适当剪短以保证能与前处理液充分接触），再加入200 μL 组织前处理液（BC-6）和40 μL 蛋白酶K(20 mg/mL)，封上封板膜或硅胶软膜；将深孔板放入60℃的摇床中，200rpm振荡混匀3小时。
 - (5) 鼠尾组织（常规）：取适量鼠尾样本（大鼠0.3 cm，小鼠0.6 cm）置于1.5 mL离心管中，向离心管中加入200 μL 组织前处理液（BC-6）和40 μL 蛋白酶K(20 mg/mL)，按照组织样本进行研磨后65℃孵育30min或者不用研磨直接56℃过夜孵育处理，孵育后12000rpm离心2min，将上清转移至裂解液孔板中，进行后续操作。
- 2、将上述处理好的样本转移至裂解液孔中（鼠尾组织（快速）的需要在处理好的深孔板中加入对应裂解液即可），如需要去除RNA，需在工位4中加入20 μL RNase A（10mg/mL），对于羊水/细胞样本，还需在裂解液孔板中添加40 μL 蛋白酶K。
 - 3、根据装量说明及工位布板将不同组分置于仪器对应的工位处。
 - 4、程序结束后，仪器会自动停止，洗脱液对应的深孔板内为提取的核酸样品，短时间储存可以放在2-8℃，长时间还需-20℃以下保存。

【手动版】

1. 取800 μL 洗涤液III&磁珠至1.5 mL离心管中(注意：为了确保磁珠彻底重悬，请充分振荡混匀后立即吸取)，置于磁力架上静置1 min后将全部上清吸出，洗涤液III和磁珠保存待用。
2. 样本前处理：
不同样本处理方式见自动提取。
3. 将处理好的样本转移至步骤1中待用的磁珠中，再加入600 μL 的裂解液，对于全血/唾液/口腔拭子/羊水/细胞样本还需添加40 μL 蛋白酶K(20 mg/mL)，振荡混匀，置于55℃裂解10 min^b（期间颠倒混匀数次）。
b: 组织和骨髓血样本需延长至15min。
4. 将离心管置于磁力架上，静置1 min，期间反复颠倒磁力架5-6次，使可能残存在管盖上的磁珠被磁力架吸附住，小心用移液器吸去管盖和管中的液体。
5. 取下离心管，加入800 μL 洗涤液 I，将离心管振荡混匀4 min^b后再置于磁力架上，静置1 min，期间反复颠倒磁力架5-6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。b: 组织和骨髓血样本需延长至6min。
6. 重复步骤5一次。
7. 加入200 μL 洗涤液 II，如需要去除RNA，部分样本还需要加入适量的 RNase A（具体加入量参照自动提取样本处理），将离心管涡旋振荡混匀2 min^b后，再置于磁力架上，静置1 min，期间反复颠倒磁力架5-6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。b: 组织和骨髓血样本需延长至4min，骨髓血样本还需加入400 μL 增强剂。
8. 加入800 μL 步骤1中待用的洗涤液III将离心管振荡混匀2 min后，再置于磁力架上，静置1 min，期间反复颠倒磁力架5-6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。
9. 打开管盖，室温干燥2 min至乙醇挥发完全(乙醇残留和过分子干燥均会影响下一步核酸洗脱效率)。
10. 取下离心管，加入100 μL 洗脱液，振荡混匀使磁珠完全浸没在洗脱液中，再置于65℃孵育10 min，期间振荡混匀3次。
11. 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，静置1 min,待磁珠完全吸附后，小心用移液器将液体转移至新的干净的离心管中(切勿将磁珠吸出)，所得溶液即为核酸样品。短时间储存可以放在2-8℃，长时间还需-20℃以下保存。

【注意事项】

1. 操作注意安全防护：样本提取应在规定的实验场所进行，穿戴防护衣物、一次性手套和口罩；有直接接触过样本的物品应进行消毒后丢弃或再次使用。
2. 实验前应对自动核酸提取仪进行紫外线消毒，并定期清理实验台和样本提取专用移液器。

3. 接触试剂的材料均要求干燥、洁净，以防止污染。
4. 装有磁珠的深孔板或试剂瓶使用前一定要充分摇匀。
5. 血液样本提取，需要将血液恢复至室温后进行试验。
6. 对于组织样本如果加入**RNase A**混合**2min**还有**RNA**残留可以将混合时间延长至**10min**。
7. 裂解液、洗涤液 I 如果有沉淀，可在室温中重新溶解，摇匀后使用。

数据

1不同组织的提取

1.1小鼠组织

分别取不同小鼠器官进行提取。提取结果从琼脂糖凝胶电泳（图1）、纯度以及浓度（表1）等方面进行分析。实验结果表明使用本试剂盒提取的不同小鼠器官样本均可获得完整条带。

表1不同小鼠器官的提取DNA提取纯度和浓度整理总结

样本	A260/A280	A260/A230	浓度(ng/ul)
鼠肝	1.90	1.87	456.52
	1.92	1.81	415.45
鼠肾	1.91	1.86	389.35
	1.85	1.83	346.20
鼠肺	1.91	1.86	281.86
	1.86	1.86	276.04
鼠心	1.84	1.80	114.40
	1.90	1.88	117.88
鼠脾	1.84	1.88	458.83
	1.85	1.81	478.54
肌肉	1.83	1.87	158.46
	1.85	1.88	168.49
鼠尾	1.84	1.86	75.47
	1.88	1.83	70.98

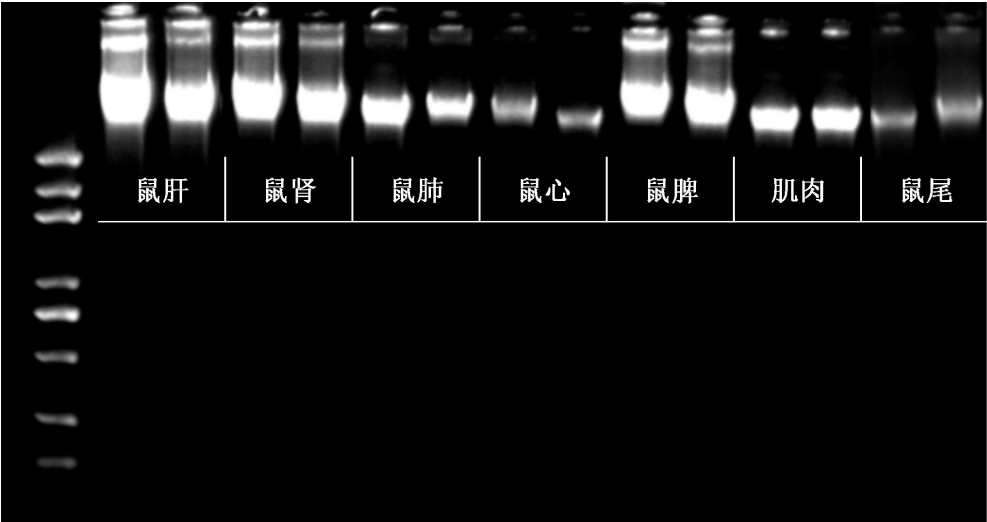


图1不同小鼠器官的提取DNA琼脂糖凝胶电泳

1.2猪组织

分别取不同猪器官进行提取。提取结果从琼脂糖凝胶电泳（图2）、纯度以及浓度（表2）等方面进行分析。实验结果表明使用本试剂盒提取的不同猪器官样本均可获得完整条带。

表2 不同猪器官的提取DNA提取纯度和浓度整理总结

样本	A260/A280	A260/A230	浓度(ng/ul)
猪肝	1.84	1.89	224.56
	1.84	1.88	220.75
猪肺	1.82	1.85	216.84
	1.82	1.89	210.12
猪肾	1.82	1.81	223.48
	1.81	1.83	237.19
猪脾	1.81	1.84	304.81
	1.81	1.82	314.56
猪心	1.82	1.86	84.52
	1.83	1.83	86.74
猪肉	1.88	1.82	94.26
	1.84	1.87	93.18

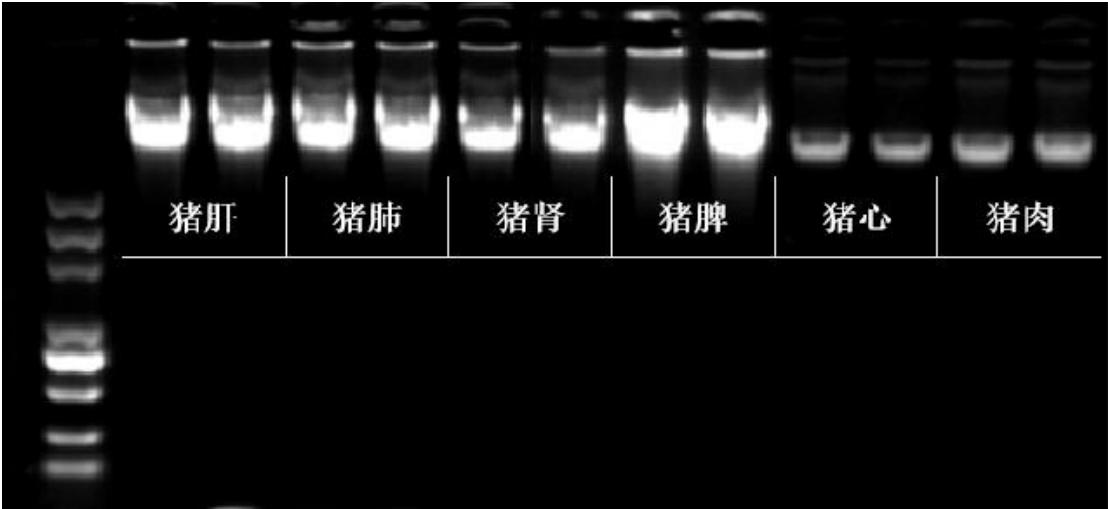


图2 不同猪器官的提取DNA琼脂糖凝胶电泳

1.3水产组织

分别取不同水产组织进行提取。提取结果从琼脂糖凝胶电泳（图3）、纯度以及浓度（表3）等方面进行分析。实验结果表明使用本试剂盒提取的不同水产组织均可获得完整条带。

表3 不同水产的提取DNA提取纯度和浓度整理总结

样本	A260/A280	A260/A230	核酸(ng/uL)
贝壳	1.81	1.95	215.28
	1.81	1.97	212.15
花甲	1.85	1.83	205.89
	1.82	1.89	208.48
基围虾	1.81	1.76	84.86
	1.80	1.79	81.23
黄辣丁	1.80	1.82	80.19

	1.81	1.97	78.49
斑马鱼	1.82	1.84	100.48
	1.86	1.81	103.86
龙虾	1.88	1.81	110.45
	1.86	1.89	116.88

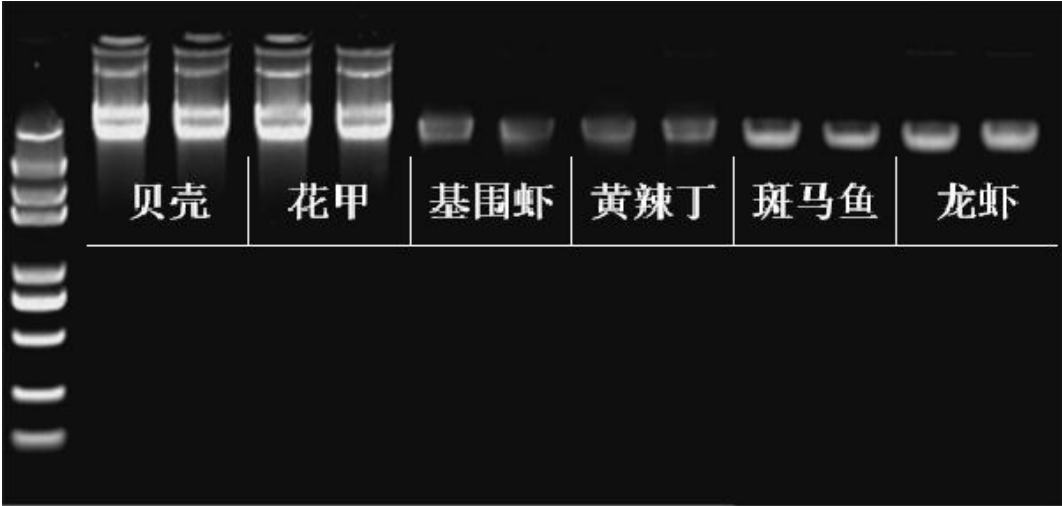


图3 不同水产组织的提取DNA琼脂糖凝胶电泳

2.细胞提取

分别取不同细胞数进行提取，洗脱体积100μL。提取结果从纯度以及浓度（表4）等方面进行分析。实验结果表明使用本试剂盒提取的不同细胞个数下单个细胞的提取浓度在6pg左右，这个结果与文献报道一致。

表4 不同细胞浓度的提取DNA提取纯度和浓度整理总结

细胞数 (万)	A260/A280	A260/A230	核酸 (ng/uL)	Qubit	Q/N	单个细胞得 率 (pg)
1	1.47	1.01	1.00	0.70	70.23%	7.0
2	1.21	0.37	2.07	1.37	66.06%	6.9
5	1.27	0.91	5.23	3.32	63.43%	6.6
10	1.80	1.63	9.94	7.32	73.63%	7.3
20	1.78	1.76	18.38	15.60	84.86%	7.8
50	1.83	2.06	37.08	31.70	85.50%	6.3
100	1.79	2.11	85.15	61.10	71.76%	6.1
200	1.79	2.01	203.16	149.00	73.34%	7.5
500	1.88	2.29	455.98	370.00	81.14%	7.4