

磁珠法土壤基因组提取试剂盒

【产品名称】

商品名称：磁珠法土壤基因组提取试剂盒

【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	16T预分装	96T预分装	20T 非预分装	100T 非预分装	500T 非预分装
Buffer A	9 mL	55 mL	9 mL	55 mL	275 mL
Buffer B	2 mL	12 mL	2 mL	12 mL	60 mL
Buffer C	2 mL	12 mL	2 mL	12 mL	60 mL
裂解液	96孔板*1板	96孔板*1板	13 mL	65 mL	375 mL
磁珠&洗涤液I		96孔板*1板	13 mL	65 mL	375 mL
洗涤液 II		96孔板*2板	26 mL	65 mL*2	325 mL*2
洗脱液		96孔板*1板	4 mL	20 mL	60 mL
RNase A	200 μ L	1.2 mL	200 μ L	1.2 mL	1.2 mL*5
研磨管（选配）	20支	100支	20支	100支	500支

注：如果不用配套研磨管，建议每反应加入1g的1mm氧化锆珠+2颗3mm氧化锆珠组合。

【储存条件及有效期】

有效期12个月，RNase A置于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C冻存，试剂盒其他组分置于室温(10~30 $^{\circ}$ C)保存。

【样本要求】

适用于100-500 mg土壤和环境样本（如废水、淤泥、垃圾、石膏、食物、真菌、植物、根、酵母、沉积物等）的基因组DNA提取。

【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
工位	2	1	2	3	4	5	2
等待时间	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
混合时间	30s	420s	240s	60s	60s	180s	30s

吸磁时间	60s	90s	60s	60s	60s	90s	00:00:00
体积	600 μ L	900 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	100 μ L	600 μ L
温度	--	25℃	--	--	--	65℃	--

表2：96通道全自动核酸提取仪程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七
工位	2	1	2	3	4	6	2
等待时间	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
混合时间	30s	420s	240s	60s	60s	180s	30s
吸磁时间	60s	90s	60s	60s	60s	90s	00:00:00
体积	600 μ L	900 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	100 μ L	600 μ L
温度	--	25℃	--	--	--	65℃	--

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：

表3：组分装量-分布表

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

3、在研磨管中加入400 μ L Buffer A（干燥土壤可以增加体积到500 μ L）、60 μ L Buffer B和10 μ L RNase A。

4、样本前处理

细菌、真菌菌液：取100-200 μ L菌体培养液（对于200-2000 μ L样本，转移样本至离心管中，12000 rpm离心2min，弃掉大部分上清，仅保留200 μ L以内液体重悬菌体）至研磨管中。

水体滤膜：将滤膜卷起，剪成数段，加入研磨管中。

土壤和环境样本：直接加入研磨管中。

注意：加入研磨管内的体积不得超过研磨管高度的2/3（大约在防滑环下部）。

5、涡旋混匀，使用研磨仪研磨60 Hz 30 s等待10 s运行次数3次（对于比较难破碎的样本可以适当增加研磨次数到4-6次；若无研磨仪，在涡旋仪上涡旋振荡15 min）。

6、研磨完后，转移研磨管至金属浴或水浴锅中70℃，温浴10 min（对于特别难处理的样本可以将温度提高到90℃）。

7、取出研磨管，瞬时离心5-10s，加入80 μ L Buffer C，涡旋30 s混匀，12000 rpm离心4 min，转移上清（大约300 μ L）至裂解液深孔板的样孔中（S-48/S-16仪器，取上清转移至深孔板的第1、7列），吸取时应尽量避免吸到沉淀。

8、将裂解液的深孔板放至工位1上，将磁珠&洗涤液 I（使用前先颠倒混匀数次使磁珠重悬，再轻甩孔板使溶液均集中到孔板底部，小心撕去封口铝膜，避免孔板振动，液体溅出）、洗涤液 II、洗涤液 II、洗脱液的深孔板分别置于工位2/3/4/6工位上，运行程序。

9、程序结束后，仪器会自动停止。洗脱液对应的的深孔板内为提取的核酸样品（16通道仪器深孔板第5、11列内为提取的核酸样品），该样品可以直接用于下游实验。若要长时间保存，可以封装或转移至新的容器中，于-20℃冰箱保存。

★ 【手动版】

1. 在研磨管中加入400 µL Buffer A（保存液中的粪便样本可以减少体积到300 µL，固体粪便或干燥土壤可以增加体积到500 µL）、60 µL Buffer B和10 µL RNase A。
2. 样本前处理：
细菌、真菌菌液：取100-200 µL菌体培养液（对于200-2000 µL样本，转移样本至离心管中，12000 rpm离心2 min，弃掉大部分上清，仅保留200 µL以内液体重悬菌体）至研磨管中。
水体滤膜：将滤膜卷起，剪成数段，加入研磨管中。
土壤和环境样本：称取100-500 mg样本至研磨管中。
注意：加入研磨管内的体积不得超过研磨管高度的2/3（大约在防滑环下部）。
3. 涡旋混匀，使用研磨仪研磨60 Hz 30 s等待10 s运行次数3次（对于比较难破碎的样本可以适当增加研磨次数到4-6次；若无研磨仪，在涡旋仪上涡旋振荡15 min）。
4. 研磨完后，转移研磨管至金属浴或水浴锅中70℃，温浴10 min（对于特别难处理的样本可以将温度提高到90℃）。
5. 取出研磨管，瞬时离心5-10 s，加入80 µL Buffer C，涡旋30 s混匀，12000 rpm离心4 min，转移上清（大约300 µL）至1.5 mL干净离心管中。
6. 转移600 µL磁珠&洗涤液I至另一干净的1.5 mL离心管中（转移前先涡旋混匀磁珠&洗涤液I），将离心管放置磁力架上磁吸1 min，转移上清至另一干净的1.5 mL离心管中备用，将步骤5中的液体转移至剩下磁珠的离心管中。
7. 加入600 µL裂解液，室温涡旋振荡结合10 min。
8. 将离心管放置磁力架上磁吸1 min，弃上清，加入步骤6中备用液体，涡旋混匀5 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. 取下离心管，加入600 µL 洗涤液II，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。
10. 按照步骤9的方法重复一次。
11. 打开管盖，室温干燥3-5 min 至乙醇挥发完全(乙醇残留和过分干燥均会影响下一步核酸洗脱效率)。
12. 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5 min，期间振荡混匀3次。
13. 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。
14. 该样品可以直接用于下游实验，若要长时间保存，请置于-20℃冰箱。

【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. 除非另有说明，所有的操作均在室温（10-30℃）完成。
3. 实验前应对全自动核酸提取仪进行紫外线消毒，并用75 %乙醇定期清理实验台和样本提取专用移液器。
4. 接触试剂的材料均要求干燥、洁净，以防止污染。
5. Buffer A、Buffer B和裂解液可能会有沉淀析出，属正常现象，将其置于42℃烘箱或水浴中，待沉淀溶解后混匀再用。
6. 手动提取清洗过程，每一步的清洗液都必须吸取干净，如果管壁有液珠，可以轻拍磁力架，让液滴流到制备管底部，再吸取干净。
7. 手动提取时，磁珠干燥放置时间不宜过长，过度干燥会影响提取结果。

数据

1与TX对比实验

选取淤泥、塘泥土、砂石土、根际土、林间土和草坪土这6种土壤，运用本试剂盒（下称“本”）与TX的提取试剂盒进行对比测试，每个土样各提取两次，每次测试称取200mg土样。提取产物进行浓度、纯度（表1）、琼脂糖凝胶电泳（图1）检测，结果显示本试剂盒提取效果优于TX。

表1 与TX试剂盒对比提取纯度和浓度平均值整理总结

土壤	品牌	A260/A280	A260/A230	平均 A260/A230	浓度(ng/ μl)	平均浓度	Qubit 浓度	Q/N(%)
淤泥土	本	1.79	1.54	1.60	23.77	23.04	14.9	62.68
		1.81	1.67		22.31			
	TX	1.87	1.49	1.50	36.79	36.65	18.80	51.10
		1.88	1.51		36.51			
塘泥土	本	1.85	1.81	1.83	50.78	50.29	40.1	79.74
		1.86	1.85		49.79			
	TX	1.84	1.48	1.49	26.92	28.96	14.80	54.98
		1.84	1.50		31.00			
砂石土	本	1.89	1.84	1.90	14.63	16.41	8.22	56.19
		1.98	1.97		18.19			
	TX	1.97	1.91	1.83	47.05	46.99	11.60	24.65
		1.93	1.74		46.93			
根际土	本	1.91	1.92	1.94	20.88	21.45	13.10	62.74
		1.93	1.96		22.03			
	TX	1.90	1.72	1.71	45.86	42.66	14.30	31.18
		1.94	1.71		39.46			
林间土	本	1.82	1.80	1.80	19.41	19.35	14.20	73.16
		1.84	1.80		19.29			
	TX	1.90	1.75	1.66	40.64	40.66	16.8	41.34
		1.87	1.58		40.68			
草坪土	本	1.92	1.90	1.88	14.12	14.69	11.30	80.03
		1.87	1.86		15.26			
	TX	1.89	1.66	1.69	28.59	29.23	7.38	25.81
		1.90	1.42		29.87			

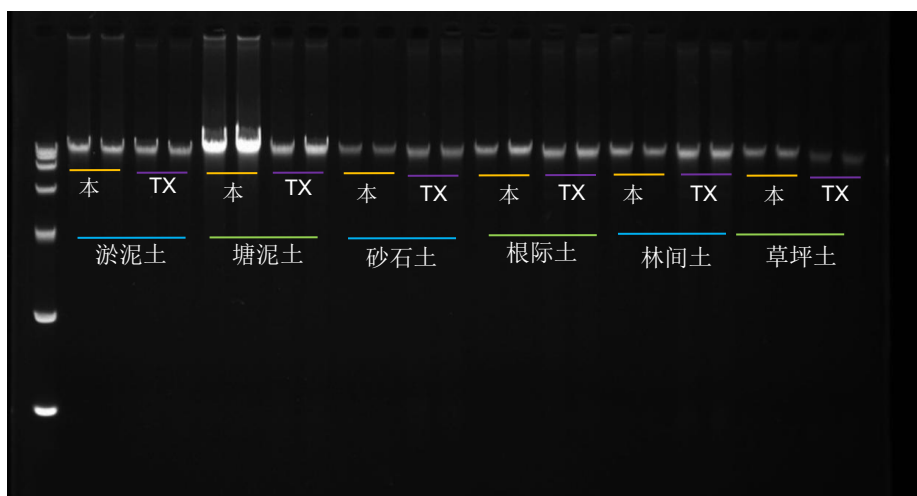


图14 与TX试剂盒对比琼脂糖凝胶电泳结果

2与MX对比实验

选取淤泥、塘边土、林间土和苔藓土这4种土壤，运用本试剂盒（下称“本”）和MX厂家的提取试剂盒进行对比测试，本试剂盒每个土样各提取6次，MX提取试剂盒每个土样各提2次，每次测试称取200mg土样。提取产物从浓度、纯度（表2）、琼脂糖凝胶电泳（图2-3）进行检测，结果显示本试剂盒提取效果优于MX。

表 2 与 MX 试剂盒对比提取纯度和浓度平均值整理总结

土壤	品牌	A260/A280	平均 A260/A280	A260/A230	平均 A260/A230	浓度 (ng/ μl)	平均 浓度	Qubit 浓度	Q/N(%)
淤泥	本	1.86	1.86	1.21	1.31	7.73	8.33	7.40	95.73
		1.83		1.43		8.11			
		1.81		1.35		8.40			
		1.92		1.37		8.25			
		1.86		1.29		8.87			
		1.87		1.20		8.61			
	MX	1.89	2.00	1.06	1.30	6.22	6.57	5.43	87.30
		2.12		1.55		6.93			
塘边土	本	1.86	1.85	1.62	1.65	36.69	37.74	30.60	83.40
		1.84		1.62		38.32			
		1.85		1.74		37.11			
		1.85		1.65		38.46			
		1.85		1.66		37.26			
		1.84		1.63		38.61			
	MX	1.84	1.86	1.43	1.55	33.59	35.64	27.00	80.38
		1.88		1.67		37.70			
林间土	本	1.81	1.80	1.69	1.71	46.76	47.82	45.4	97.09
		1.79		1.66		47.74			
		1.81		1.70		47.96			
		1.80		1.74		48.47			
		1.81		1.75		47.74			
		1.81		1.70		48.24			
	MX	2.19	2.03	2.08	1.93	35.32	34.48	31.5	89.18
		1.87		1.78		33.63			
苔藓土	本	1.78	1.78	1.37	1.51	25.13	25.47	24.06	95.74
		1.78		1.55		26.45			
		1.80		1.34		23.54			
		1.76		1.58		26			
		1.78		1.57		25.87			
		1.77		1.65		25.82			
	MX	1.88	1.94	1.56	1.69	25.13	25.93	25.55	96.60
		2.00		1.82		26.45			

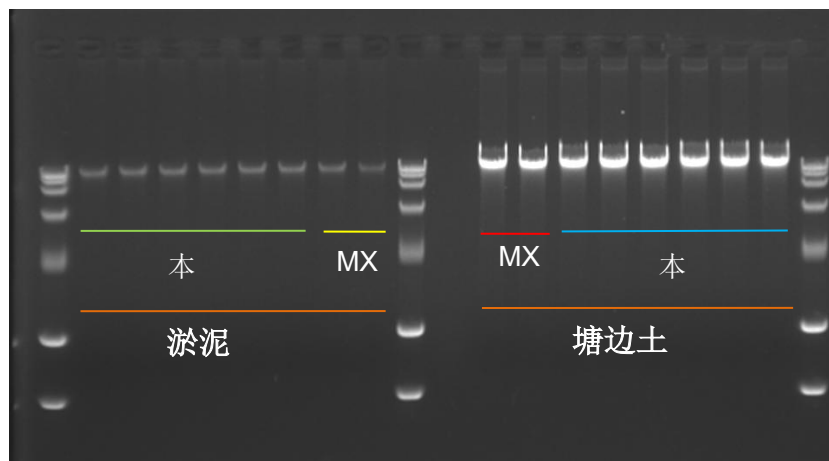


图2 与MX厂家试剂盒对比琼脂糖凝胶电泳结果（淤泥-塘边土）

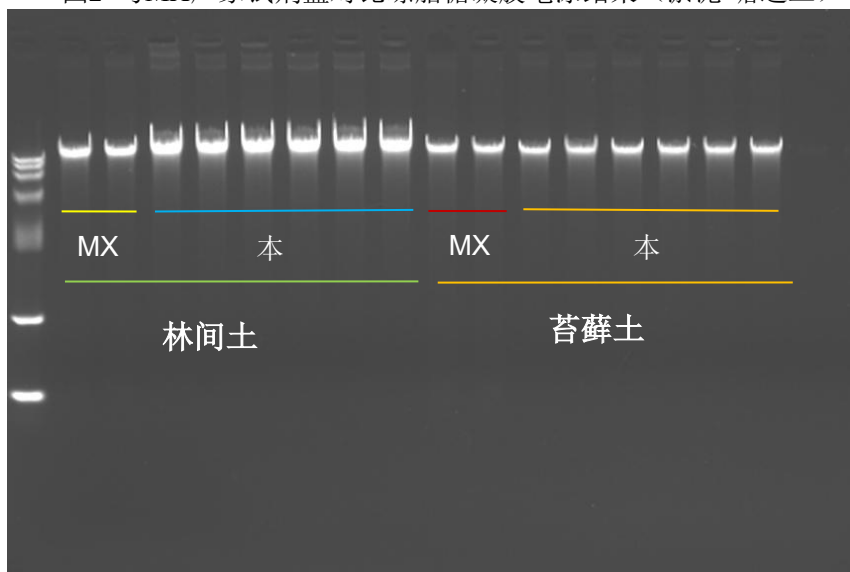


图3 与MX厂家试剂盒对比琼脂糖凝胶电泳结果（林间土-苔藓土）