***Ver:*** ***2408***

**病原微生物DNA/RNA提取试剂盒(磁珠法)**

**(BW-MGD2411)**

本试剂盒用于病原微生物DNA/RNA的提取纯化，可从多种类型样本中纯化细菌、真菌及病毒DNA/RNA，诸如血液、血清、血浆、尿液、脑脊液、痰液、肺泡灌洗液等样本。纯化后的DNA/RNA可用于下游实验，如PCR、qPCR等实验。

**试剂盒组分**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Catalog#** | **BW-MGD2411-A00** | **BW-MGD2411-A32-32** | | **BW-MGD2411-A32** | | **BW-MGD2411-A96** | | **BW-MGD2411-A24** | |
| **Manual operation** | **Well position** |  | **Well position** |  | **Plate position** |  | **Plate position** |  |
| **Preps** | **50 T** | **1Tⅹ32** | | **1ⅹ32T** | | **1ⅹ96T** | | **1x24T** | |
| **Lysis** **Buffer** **A** | 50mL | Well 1 | 600 μL | Column 1/7 | 600 μL | Plate 2 | 600 μL | Plate 2 | 2.25mL |
| **MgPure** **Beads** | 1.25mL | Well 2 | 400 μL | Column 2/8 | 400 μL | Plate 3 | 400 μL | Plate 3 | 1mL |
| **Wash** **Buffer** **1** | 50mL | Well 3 | 600 μL | Column 3/9 | 600 μL | Plate 4 | 600 μL | Plate 4 | 1mL |
| **Wash** **Buffer** **2** | 100mL | Well 4 | 800 μL | Column 4/10 | 800 μL | Plate 5 | 800 μL | Plate 5 | 1mL |
| **Wash** **Buffer** **3** | - | Well 5 | 800ul | Column 5/11 | 800ul | Plate 6 | 800μL | Plate 6 | 1mL |
| **DEPC-Treated ddH2O** | 10mL | Well 6 | 80 μL | Column 6/12 | 80 μL | Plate 8 | 80 μL | Plate 8 | 200μL |
| **Proteinase K** | 1.25mL | 800 uL | | 800 uL | | 2ⅹ1.25mL | | 2.5mL | |
| **Tip** **Comb** | - |  | 8 |  | 4 |  | 1 |  | 1 |

\*BW-MGD2411-A32 and BW-MGD2411-A32-32 用八联孔磁棒套, BW-MGD2411-A96 用96孔磁棒套，BW-MGD2411-A24用24孔磁棒套.

**存储与运输**

本试剂盒自生产之日起可保存12个月。所有试剂及用品可保存于室温（15-25℃），室温运输。

**注意事项**

* 使用本试剂盒请做好安全防护，穿戴实验服及佩戴一次性口罩，在BSL-2或更高等级实验室进行实验操作；
* Lysis Buffer A含有胍盐，不要让缓冲液接触到皮肤、眼睛以及黏膜，如果确实发生，请立即用大量清水清洗并就医；
* Lysis Buffer A可能会沉淀，在使用之前请37℃溶解后使用；
* 需自备1.5mL无DNase/RNase离心管，单条试剂托架（针对**B**BW-MGD2411-A32-32试剂盒，可从倍沃购买货号 BW-CB136）
* RNase A(Cat No.BW-B0052)/ Lysozyme (Cat No.BW-B003)不包含在试剂盒内，可单独购买。

**样本处理**

**血清、血浆样本：**

取300-1000 μL血清样本，8000 rpm，离心5 min，保留200 μL下层血清，备用。

**脑脊液、肺泡灌洗液和痰液样本**

转移700 μL~800 μL 样本至2mL离心管中（加入500uL氧化锆珠或玻璃珠），放入破壁仪中破壁1分钟，结束后8000rpm离心1分钟，转移200uL上清至1.5mL管或板中备用。

**粘稠痰液样本:**

1. 转移500uL样本至1.5mL离心管中，再加入500 μL of 2% NaOH溶液（需自备），涡旋振荡1分钟，室温放置15-20分钟（不超过20分钟），直到粘稠液体变成清夜；
2. 10000rpm离心1分钟，弃去上清，加入200uLPBS或生理盐水或实验用水，用枪头吹打混匀，备用；

★2% NaOH溶液的配制：取1g NaOH，溶于40 mL纯化水中，溶解后定容至50 mL。

**尿液样本**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本体积 | ≤2mL | ≤10mL | ≤40mL | |
| 离心管体积 | 2mL | 15mL | 50mL | |
| 离心条件 | 5000rpm x10min | | | |
| PBS或生理盐水 | 200ul | 200ul | | 1-2.25mL |
| 对应试剂盒 | BW-MGD2411-A32/A96 | | BW-MGD2411-A24 | |

转移相应体积的样本至离心管，5000rpm离心10分钟，弃去上清，加入相应体积的PBS或生理盐水，重悬，备用。

**微生物培养液:**

1. 革兰氏阴性菌:

取1 mL培养物于1.5 mL离心管中，8,000 rpm，离心5 min，弃上 清液700 μL，保留300 μL震荡重悬微生物细胞，备用。

1. 革兰氏阳性菌培养物：

取1 mL菌液于1.5 mL离心管中，8,000 rpm，离心5 min，弃上清 液800 μL，保留200 μL震荡重悬微生物细胞，加入100 µL溶菌酶 (40 mg/mL)，37℃孵 育20 min，备用。

1. 真菌培养物：

取1 mL菌液于1.5 mL离心管中，8,000 rpm，离心5 min，弃上清液800 μL， 保留200 μL震荡重悬微生物细胞，加入100 µL溶菌酶消化液(40 mg/mL) 和2 μL 酵母溶 壁酶溶液（10 u/μL），37℃孵育20 min，备用。

**操作步骤**

**手工操作 (BW-MGD2411-A00)**

1. 转移200~400μL预处理样本至1.5mL离心管中, 加入600μL **Lysis Buffer A** 和25uL **proteinase K**混匀， 55℃孵育，混匀15分钟。可选: 如仅需要基因组DNA,在Lysis Buffer A加入5uL RNase。
2. 加热结束后恢复至室温，加入20 μL **MgPure Beads** （使用前需混匀）室温涡旋混匀 5分钟。
3. 放入磁力架上吸磁2分钟，小心弃去上清，从磁力架取出。
4. 加入 600 μL **Wash** **Buffer 1** 涡旋混匀30秒，放入磁力架吸磁2分钟，小心弃去上清，从磁力架取出。
5. 加入 800 μL **Wash** **Buffer 2** 涡旋混匀30秒，放入磁力架吸磁2分钟，小心弃去上清，从磁力架取出。
6. 重复步骤5一次，尽可能弃去液体。
7. 放入磁力加上，开盖室温晾干5-10 分钟，从磁力架取出。
8. 加入 80 μL **DEPC-Treated ddH2O** 56℃涡旋振荡5分钟（或每隔2分钟振荡30秒），结束后放入磁力架吸磁3分钟，转移清夜至新的1.5mL管中，如不及时实验，可保存至-20℃。

**核酸提取仪**（倍沃 BW Express 16 /SP1604 or 奥盛 Auto-Pure 32A）**（BW-MGD2411-A32-32）**

1. 根据样本情况取出相应个数单个试剂条，将试剂及磁珠等轻轻甩到底部（观察第一孔裂解液是否有沉淀，如有，可置于37℃加热溶解），放入试剂托加上；
2. 撕去封口膜，加入**200~400 uL**预处理样本至**第一列孔**中,再加入25uL **proteinase K**。可选: 如仅需要基因组DNA,在Lysis Buffer A加入5uL RNase；
3. 装载8联磁棒套；
4. 根据表1设置好提取纯化程序，开始运行程序；
5. 运行结束后，取出托架将样本洗脱液转移至新的1.5mL离心管，备用，如不及时实验，可保存于-20℃。

**表1.** 纯化程序（ 奥盛 Auto-Pure 32A ）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | Well | Name | Mix  time (min) | Magnet  (sec) | Wait  time (min) | Vol.  (μL) | Mix  speed (1- 10) | Temp.  (℃) | Mix pos  (0- 100%) | Mix amp  (1- 100%) | Magnet pos  (0- 100%) | Magnet speed (1- 10) |
| 1 | 1 | Lysis | 15 | 0 | 0 | 1000 | 10 | 55 | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 2 | 2 | Beads | 0.5 | 60 | 0 | 800 | 8 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 3 | 1 | Bind | 5 | 40 | 0 | 800 | 9 | 100 | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 4 | 3 | Wash1 | 1 | 20 | 0 | 600 | 9 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 5 | 4 | Wash2 | 1 | 20 | 0 | 800 | 9 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 6 | 5 | Wash3 | 1 | 20 | 1 | 800 | 9 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 7 | 6 | Elute | 5 | 40 | 0 | 80 | 10 | 90 | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 8 | 4 | Drop | 0.5 | 0 | 0 | 800 | 8 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |

**核酸提取仪**（倍沃 BW Express 16 /SP1604 or 奥盛 Auto-Pure 32A **(BW-MGD2411-A32)**

1. 取出试剂板，将试剂及磁珠等轻轻甩到底部（观察**第一/七列**裂解液是否有沉淀，如有，可置于37℃加热溶解）；
2. 撕去封口膜，加入**200~400 uL**预处理样本至**第一/七列**中，再加入25uL **proteinase K**，将试剂板放入设备中。可选: 如仅需要基因组DNA,在Lysis Buffer A加入5uL RNase；
3. 装载8联磁棒套；
4. 根据表2设置好提取纯化程序，开始运行程序；
5. 运行结束后，取出试剂板将样本洗脱液转移至新的1.5mL离心管，备用，如不及时实验，可保存于-20℃。

**表 2.** 纯化程序（ 奥盛 Auto-Pure 32A ）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | Well | Name | Mix time (min) | Magnet  (sec) | Wait time (min) | Vol.  (μL) | Mix speed (1-10) | Temp.  (℃) | Mix pos  (0-100%) | Mix amp  (1-100%) | Magnet pos (0-100%) | Magnet speed (1-10) |
| 1 | 1 | Lysis | 15 | 0 | 0 | 1000 | 10 | 55 | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 2 | 2 | Beads | 0.5 | 10 | 0 | 400 | 10 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 3 | 1 | Bind | 5 | 20 | 0 | 1000 | 10 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 4 | 3 | Wash1 | 1 | 10 | 0 | 600 | 10 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 5 | 4 | Wash2 | 1 | 10 | 0 | 800 | 10 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 6 | 5 | Wash3 | 1 | 10 | 1 | 800 | 10 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 7 | 6 | Elute | 5 | 20 | 0 | 100 | 10 | 85 | 0 | 80 | 0 | 1 |
| 8 | 2 | Drop | 0.5 | 0 | 0 | 400 | 5 | OFF | 0 | 80 | 0 | 1 |

**核酸提取仪**（奥盛 Auto-Pure 96 **(BW-MGD2411-A32)**

1. 取出Lysis Buffer A板，将试剂及磁珠等轻轻甩到底部（观察裂解液是否有沉淀，如有，可置于37℃加热溶解）；
2. 撕去封口膜，加入**200~400 uL**预处理样本至Lysis Buffer A板中，再加入25uL **proteinase K**，将板放入2号板位。可选: 如仅需要基因组DNA,在Lysis Buffer A加入5uL RNase；
3. 撕去所有试剂板封口膜，按照表3将对应的试剂板和磁棒套放入对应板位中；
4. 根据表3设置好提取纯化程序，开始运行程序；
5. 运行结束后，取出洗脱板将样本洗脱液转移至新的1.5mL离心管，备用，如不及时实验，可保存于-20℃。

**表 3.** 纯化程序（ 奥盛 Auto-Pure 96A ）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | Name | Plate | Mix Time (min) | Mix Amp (%) | Wait Time (min) | Vol.  (μL) | Mix Speed (1-10) | Temp.  (℃) | Seg-  ments (0-5) | 1st  Seg.  time (s) | 2nd  Seg.  time  (s) | 3rd  Seg. time (s) | 4th  Seg.  time (s) | 5th  Seg.  time  (s) | Cycle times  (1-10) | Mag. speed (1-10) | Lip-lvl  (0-30s) | Anti-  Splash  (0-30s) |
| 1 | Load | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | Lysis | 2 | 15 | 80 | 0 | 1000 | 9 | 55 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| 3 | Beads | 3 | 0.3 | 80 | 0 | 400 | 4 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | Bind | 2 | 5 | 80 | 0 | 1000 | 10 | OFF | 2 | 10 | 10 | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | Wash1 | 4 | 1 | 80 | 0 | 600 | 10 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | Wash2 | 5 | 1 | 80 | 0 | 800 | 10 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | Wash3 | 6 | 1 | 80 | 1 | 800 | 10 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 8 | Elute | 8 | 5 | 80 | 0 | 100 | 3 | 85 | 1 | 20 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | Unload | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**核酸提取仪**（奥盛 Auto-Pure 24 **(BW-MGD2411-A24)**

1. 取出Lysis Buffer A板，将试剂及磁珠等轻轻甩到底部（观察裂解液是否有沉淀，如有，可置于37℃加热溶解）；
2. 撕去封口膜，加入**1~2.25mL**预处理样本至Lysis Buffer A板中，再加入**100 μL** **proteinase K**，将板放入2号板位。可选: 如仅需要基因组DNA,在Lysis Buffer A加入20uL RNase；
3. 撕去所有试剂板封口膜，按照表4将对应的试剂板和磁棒套放入对应板位中；
4. 根据表4设置好提取纯化程序，开始运行程序；
5. 运行结束后，取出洗脱板将样本洗脱液转移至新的1.5mL离心管，备用，如不及时实验，可保存于-20℃。

**表 4.** 纯化程序（ 奥盛 Auto-Pure 24A ）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | Name | Plate | Mix Time (min) | Mix Amp (%) | Wait Time (min) | Vol.  (μL) | Mix Speed (1-10) | Temp.  (℃) | Seg-  ments (0-5) | 1st  Seg.  time (s) | 2nd  Seg.  time  (s) | 3rd  Seg. time (s) | 4th  Seg.  time (s) | 5th  Seg.  time  (s) | Cycle times  (1-10) | Mag. speed (1-10) | Lip-lvl  (0-30s) | Anti-  Splash  (0-30s) |
| 1 | Load | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | Lysis | 2 | 15 | 80 | 0 | 5000 | 7 | 55 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| 3 | Beads | 3 | 0.3 | 80 | 0 | 1000 | 4 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | Bind | 2 | 5 | 80 | 0 | 5000 | 8 | OFF | 2 | 10 | 10 | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | Wash1 | 4 | 1 | 80 | 0 | 1000 | 8 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | Wash2 | 5 | 1 | 80 | 0 | 1000 | 8 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | Wash3 | 6 | 1 | 80 | 1 | 1000 | 8 | OFF | 1 | 10 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 8 | Elute | 8 | 5 | 80 | 0 | 200 | 3 | 85 | 1 | 20 | - | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | Unload | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**杭州倍沃医学科技有限公司**

[www.beiwobiomedical.com](http://www.biomiga.com.cn/)

**400-115-2855**

[market@beiwobiomedical.com](mailto:sales@biomiga.com.cn)