



## 支原体DNA样本制备试剂盒（磁珠法）

货号：OPA-E101

规格：50 Preps

**重要提示：在进行实验之前请仔细阅读本手册。**

**本试剂盒仅用于科研使用，不可用于诊断或治疗应用。**

## 【产品信息】

支原体 DNA 样本制备试剂盒用于提取生物制品中支原体 DNA。

在进行检测支原体 DNA 实验之前，请使用该试剂盒对生物样品进行支原体 DNA 提取。关于支原体 DNA 检测的产品信息，请参阅相关支原体快速检测试剂盒（OPA-S101）的用户指南（[ACROBiosystems.com](http://ACROBiosystems.com)）。

## 【方法原理】

本试剂盒采用磁珠法对生物制品中支原体 DNA 进行分离纯化，利用独特的缓冲体系、磁珠亲和吸附作用能有效去除蛋白质、盐离子等杂质，从复杂基质的生物样品中提取微量支原体 DNA，包括细胞库、病毒种子批以及细胞与基因治疗制品、原辅料、其他生物制品的中间品及成品。使用本试剂盒提取纯化的支原体 DNA 纯度高、质量稳定，可用于下游的支原体 qPCR 等检测。与我司的 OPA-S101 支原体快速检测试剂盒（qPCR）配套使用，定性检测生物制品中支原体的污染。

## 【注意事项】

1. 使用前须仔细阅读此说明书，请严格按照说明书操作。
2. 为有效提取样品中的 DNA，需在操作过程中避免核酸降解或外源污染，请严格控制环境、工具等引入的其他污染：操作前后请进行紫外消杀、台面清洁、通风等操作，必要时使用核酸清除剂。
3. 操作人员须穿干净的专用实验服、佩戴一次性无粉手套、口罩等；**使用一次性无菌、无核酸酶低吸附耗材，使用带滤芯枪头。**
4. 建议将样品提取与下游 PCR 操作分区，并保证各实验区的清洁度，最大限度的避免交叉污染。
5. 注意加样时更换吸头，小心操作和开关每个样品管，避免飞溅和喷洒，避免长时间开盖，最大限度避免交叉污染。

## 【组分和存储】

本试剂盒可用于 50 次支原体 DNA 样品的制备。

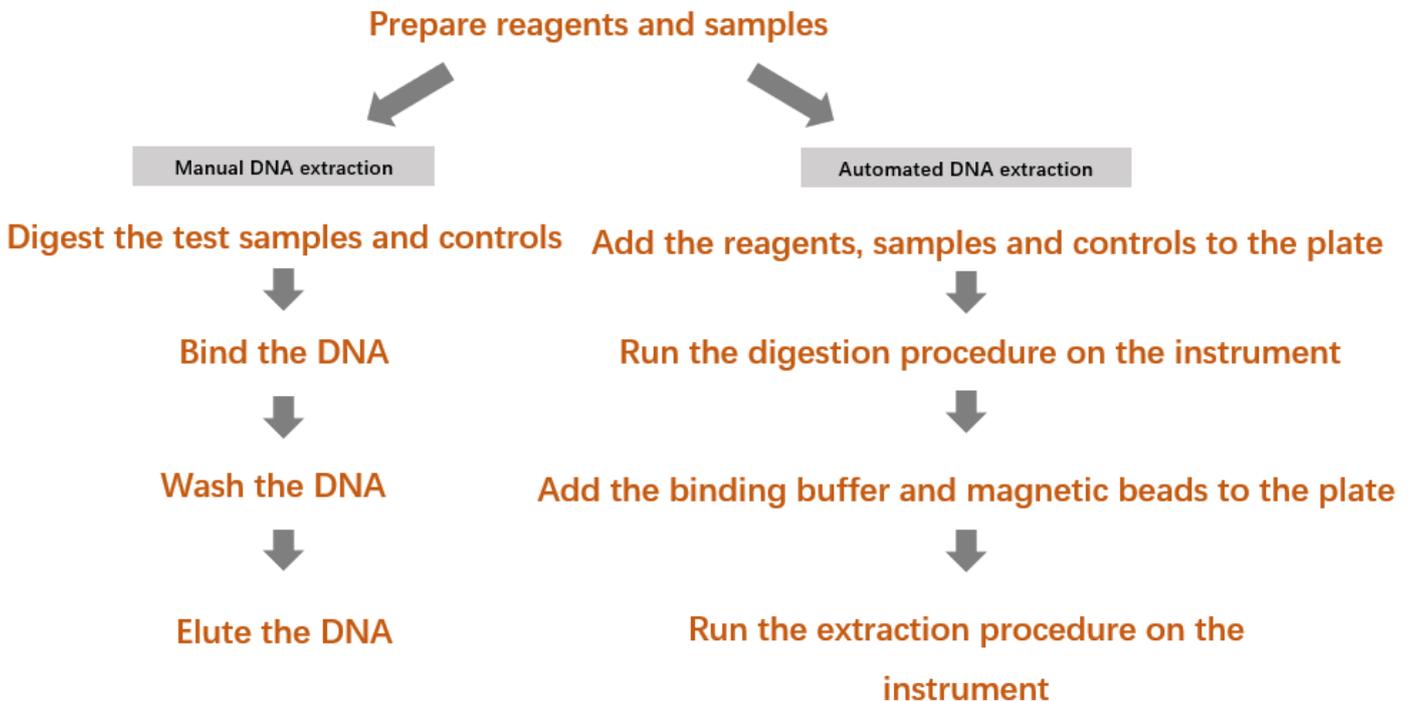
组分	装量	储存条件
裂解结合液 AL (Buffer AL)	35 mL	常温 10~30°C 储存; 更优条件为: 蛋白酶 K 和磁珠悬浮液 MB 存放于 2~8°C。
蛋白酶 K (Proteinase K)	4 mL	
磁珠悬浮液 MB (MagBeads Suspension)	1.4 mL	
助沉剂 CR (CR Powder)	310 µg	
洗液 WA (Buffer WA)	38 mL	
洗液 WB (Buffer WB)	18 mL	
洗脱液 MEB (Buffer MEB)	4 mL	
稀释液 (Sample Dilution Buffer)	5 mL	

试剂盒自生产之日起可在常温 (10~30°C) 条件下储存 12 个月。若观察到裂解结合液和洗液中有沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液置于室温 (约 25°C) 下平衡一段时间, 或在 37°C 水浴中热 10 分钟以溶解沉淀。

**【实验所需自备试剂、耗材、设备】**

设备	Magnetic stand
	Block heater
	Mini centrifuge
	Vortex
	Automated extraction instrument
	Pipettors: P1000, P200, P100, P10
试剂	Ethanol, 99.7%
	DNase/RNase-free ddH <sub>2</sub> O
耗材	Disposable gloves
	Nuclease-free, DNA-free aerosol-resistant pipet tips
	Low DNA-Binding Microcentrifuge Tubes (Nuclease-free, DNA-free), Deep-well plate, 8-Strip Tip Comb

**【实验流程】**



## 【试剂和样品准备】

### 试剂准备

1. 新开启 Buffer WA 需按照标签所示体积加入无水乙醇，充分混匀后使用。
2. 新开启 Buffer WB 需按照标签所示体积加入无水乙醇，充分混匀后使用。
3. 请提前将磁珠置于室温平衡 30min，充分涡旋混匀后使用。
4. CR Solution 制备：将含有 310  $\mu\text{g}$  助沉剂 CR Powder 管瞬时离心，加入 310 $\mu\text{L}$  DNase/RNase-free ddH<sub>2</sub>O，涡旋混匀。

**注意事项：**溶解后的助沉剂 CR Solution 需在 -20 °C 条件下保存，可将其分装成小份进行保存，避免反复冻融。

### 样品准备

#### 样品处理

本试剂盒提取样品体积为 200 $\mu\text{L}$ ，每个提取样品（包括所有待测样品、阴性提取对照和阳性提取对照）中再加入 7 $\mu\text{L}$  内控质控 DNA（Internal Control DNA，IC）（OPA-S101 提供），对不同的样品类型建议参考以下处理方式进行前处理。

1. 小体积样品：若检测样品体积  $\leq 200\mu\text{L}$ （且细胞总量  $\leq 10^7$ ）（不足 200 $\mu\text{L}$  时可使用**稀释液** Sample Dilution Buffer 或 0.9% 无菌 NaCl（**客户自备**）补足至 200 $\mu\text{L}$ ）。
2. 细胞悬浮液：若细胞总量  $\leq 10^7$ ，可将其充分混匀后直接取 200 $\mu\text{L}$ ；若细胞总量  $> 10^7$ ，需先将细胞样品 100 $\times\text{g}$  离心 5min，离心后将上清转移至新离心管中（注意不要吸取沉淀）。若上清液体积  $> 200\mu\text{L}$ ，将上清液进行 20000 $\times\text{g}$  离心 10min 进行支原体富集。离心完成后，弃掉绝大部分上清，剩余大约 200 $\mu\text{L}$  上清，用于重悬样品。
3. 细胞上清或使用过的细胞培养基：若细胞上清或培养基体积  $> 200\mu\text{L}$ ，将上清液或培养基进行 20000 $\times\text{g}$  离心 10min 进行支原体富集。离心完成后，弃掉绝大部分上清，剩余大约 200 $\mu\text{L}$  上清，用于重悬样品。
4. 非细胞样品：若为干粉状态，可用**稀释液**（Sample Dilution Buffer）将干粉样品进行溶解，再进行下一步操作；通常可将干粉样品稀释成 1 mg/mL~100 mg/mL。然后取 200 $\mu\text{L}$  悬液进行提取。
5. 阴性提取对照（Negative Extraction Control, NEC）：每次提取实验需进行阴性提取质控，在 2mL 离心管中加入 200 $\mu\text{L}$  新鲜的基质溶液（待测样品使用的缓冲液）或试剂盒提供的**稀释液**（Sample Dilution Buffer）。
6. 阳性提取对照（Positive Extraction Control, PEC）制备：在 2mL 离心管中加入 70 $\mu\text{L}$  阳性质控 DNA 【见我司配套试剂盒：OPA-S101 支原体快速检测试剂盒（qPCR）】，补充 130 $\mu\text{L}$  新鲜的基质溶液（待测样品使用的缓冲液）或**稀释液**（Sample Dilution Buffer）。

**【手动 DNA 提取过程】（如使用自动化提取设备，请见第 7 页）****样品消化**

1. 取 207 $\mu$ L 的样品（待测样品+IC）加入 1.5mL 或 2.0mL 低吸附离心管中，加入 70 $\mu$ L Proteinase K，盖紧管盖涡旋振荡混匀 30 sec；
2. 将离心管置于恒温混匀仪上 60 $^{\circ}$ C，1000 rpm 孵育 8 分钟（建议**加热盖**），孵育完成后，瞬时离心，置于管架上平衡到室温；（若无恒温混匀仪，可使用恒温水浴锅进行孵育，每隔 3 分钟颠倒混匀 2~3 次）。

**DNA 结合**

1. 向离心管中加入 600 $\mu$ L Buffer AL，**颠倒混匀**后涡旋振荡 1min，瞬时离心；
2. 向以上离心管中分别加入 25 $\mu$ L 磁珠悬浮液 MagBeads Suspension（**吸取前需充分涡旋混匀**）、3 $\mu$ L CR Solution，立即盖紧管盖颠倒混匀数次，涡旋振荡 1min，置于室温静置 10min，期间每隔 3min 涡旋振荡 20sec；
3. 瞬时离心后将离心管置于磁力架上静置 3min，待溶液澄清、磁珠完全吸附后用移液器小心移弃上清，**避免碰到磁珠**。

**DNA 漂洗**

1. 向离心管中加入 800 $\mu$ L Buffer WA（**使用前确认是否已加无水乙醇**），涡旋混匀约 10sec，瞬时离心；将离心管置于磁力架上静置 2min，待溶液澄清、磁珠完全吸附后用移液器小心移弃上清，**避免碰到磁珠**；
2. 加入 800  $\mu$ L Buffer WB（**使用前确认是否已加无水乙醇**），涡旋混匀约 10sec，瞬时离心；置于磁力架上静置 1min；待溶液澄清、磁珠完全吸附用移液器小心移弃上清，**避免碰到磁珠**；
3. 用 Buffer WB 按照上一步操作重复洗涤 1 次；
4. 瞬时离心后置于磁力架上静置 30sec，用 10  $\mu$ L 移液器尽量吸净离心管（置于磁力架上不能取下）中残液，**避免碰到磁珠**；
5. 将离心管继续保持在磁力架上，室温晾干 2~3min 至磁珠表面无光泽无干裂，防止过度干燥。

**注意事项：**

**乙醇残留会抑制后续 PCR 反应，要确保乙醇完全挥发；同时避免干燥过度，导致核酸难以洗脱；**

## DNA 洗脱

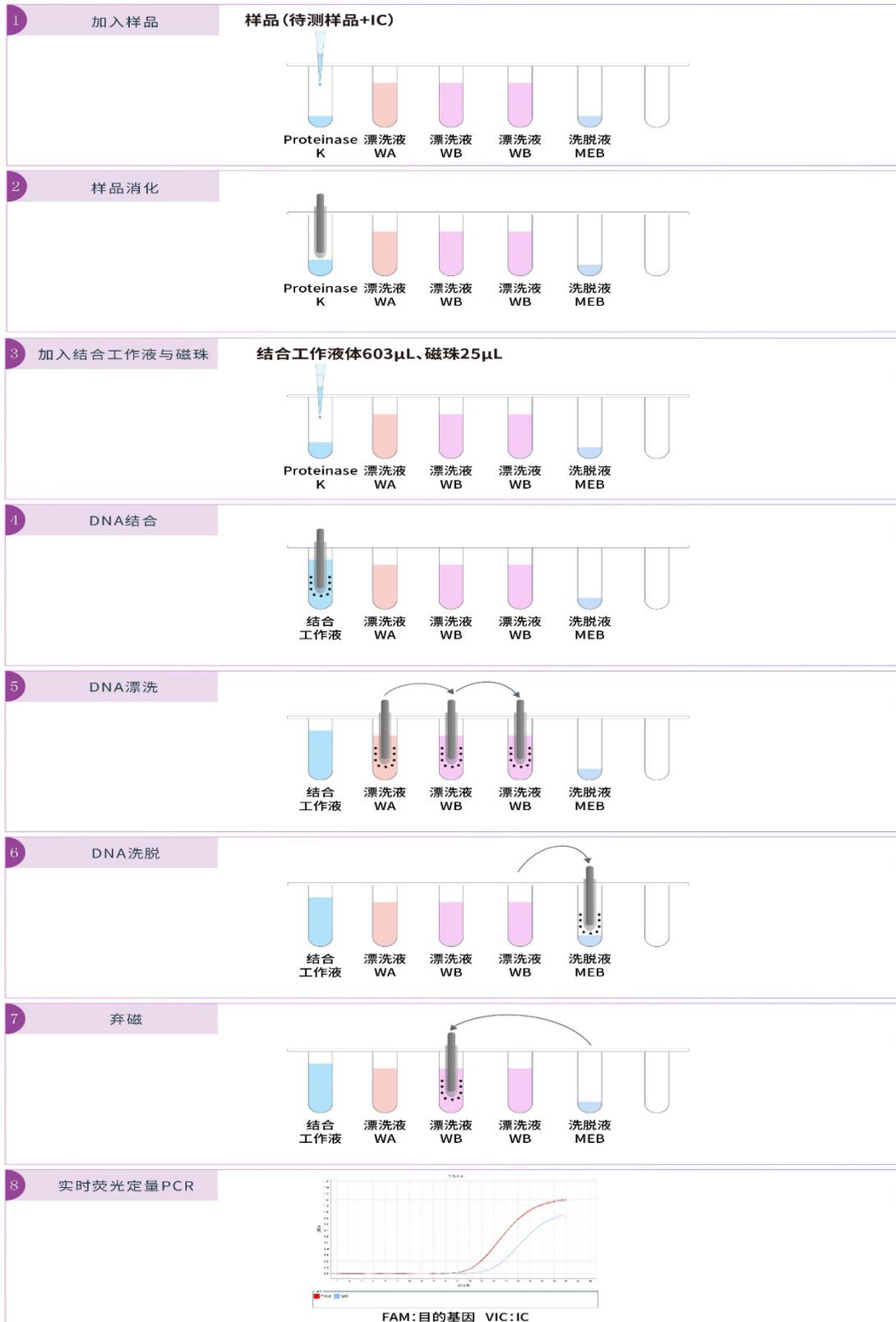
1. 加入 70 $\mu$ L Buffer MEB，用移液器轻轻吹打或涡旋振荡混匀 15~20sec 重悬磁珠，将离心管置于恒温混匀仪上 80 $^{\circ}$ C，1000 rpm 孵育 10min（若无恒温混匀仪，可使用恒温水浴锅进行孵育，孵育期间每 2~3 分钟涡旋混匀 1 次）；
2. 瞬时离心 15sec，将离心管静置于磁力架上，静置 1~3min 直至磁珠完全吸附，待溶液澄清用移液器小心吸取上清至新的 1.5 mL 低吸附离心管中进行保存（**请避免吸到磁珠**）；洗脱后的 DNA 可用于下一步 qPCR 检测。

**注意事项：**若 DNA 样品于 24 小时内进行 qPCR 检测，可暂存于 2~8 $^{\circ}$ C；长期保存需置于 -20 $^{\circ}$ C 中备用。

## 【自动化提取过程】

下述操作流程，适用于 **ACRO 全自动核酸前处理系统** (Cat. No. OPE-32S)。

**注意:** 如使用其他品牌的自动化核酸提取设备，具体操作可参考此操作说明书，结合相关仪器设定，进行调整。

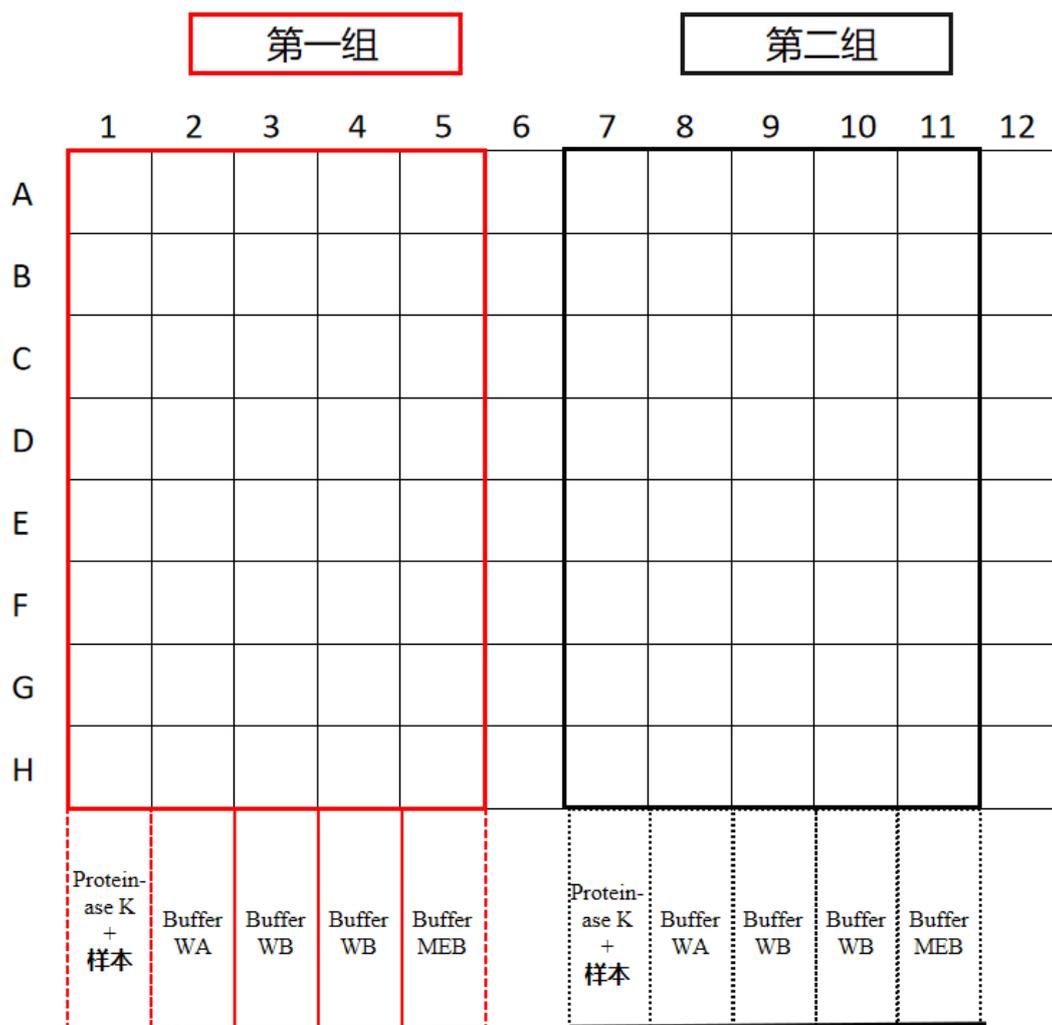


\*结合工作液: Buffer AL 600μL+CR Solution 3μL  
\*IC: 内部质控 DNA (Internal Control DNA), 每个提取样品 (包括所有待测样品、阴性提取对照和阳性提取对照) 中加入7μL。

### 仪器准备

1. 仪器使用前，用 75%乙醇擦拭仪器工作腔。
2. 关闭盖门，打开紫外灯程序，用紫外灯照射 15 分钟。

### 试剂分装



96V 底深孔板试剂分装示意图

1. 按照 96V 底深孔板试剂分装示意图将所需试剂加入深孔板中。
2. 在深孔板第 1 或者第 7 列加入 70 $\mu$ L Proteinase K。
3. 在深孔板第 2 或者第 8 列加入 Buffer WA 800  $\mu$ L。
4. 在深孔板第 3 或者第 9 列加入 Buffer WB 800  $\mu$ L。

5. 在深孔板第 4 或者第 10 列加入 Buffer WB 800  $\mu\text{L}$ 。
6. 在深孔板第 5 或者第 11 列加入 Buffer MEB 70  $\mu\text{L}$ 。

## 样品消化

1. 取 207 $\mu\text{L}$  的样品（待测样品+IC）加入到 96V 底深孔板的第 1 列或第 7 列；
2. 将加样完成的深孔板放置到仪器固定位置，插入磁棒套，关闭仪器盖门，点击运行程序 **OPA\_E101\_A**。（此程序已预设**在 ACRO 全自动核酸前处理系统 OPE-32S 中**）

**注意事项：**注意正确放置深孔板位置，注意检查磁棒套是否嵌入。

3. 程序运行完毕后，屏幕点击完成，取出深孔板。（磁棒套无需取下）

## 样品提取

1. 据实际检测需求，准备结合工作液。由于结合工作液的制备和加样过程会有损耗，故计算用量时可增加一个样品损耗数，实际配置数  $N=n+1$ ，其中  $n$  为样品数。单个样品需要 BufferAL 600  $\mu\text{L}$ +CR Solution 3 $\mu\text{L}$  共计 603 $\mu\text{L}$ 。配置方法如下：

Kit Reagents	Volume for 1 sample	Volume for Binding Buffer
Buffer AL	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L} \times N$
CR Solution	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L} \times N$
<b>Total</b>	603 $\mu\text{L}$	603 $\mu\text{L} \times N$

2. 在消化完成的深孔板第 1 或者第 7 列中先加入 603 $\mu\text{L}$  结合工作液，后加入 MagBeads Suspension 25  $\mu\text{L}$ 。

**注意事项：**结合工作液分装前需充分混匀，磁珠加入前需充分涡旋混匀。

3. 将深孔板放回仪器固定位置，关闭仪器盖门，点击运行程序 **OPA\_E101\_B**。（此程序已预设**在 ACRO 全自动核酸前处理系统 OPE-32S 中**）
4. 程序运行完毕后，屏幕点击完成，取下磁棒套，取出深孔板，立即将**第 5 列或者第 11 列**中的 Buffer MEB 移液至新的 1.5 mL 低吸附离心管或 PCR 管中进行保存，洗脱后的 DNA 可用于下一步 qPCR 检测。

**注意事项：**若 DNA 样本于 24 小时内进行 qPCR 检测，可暂存于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ ；长期保存需置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  中备

*用。移液过程可使用多道移液枪利于快速操作。*

5. 实验完成后，使用 75%乙醇擦拭仪器工作腔。关闭盖门，在主界面打开紫外灯程序，使用紫外灯照射 30 分钟。

**注意事项：***建议两次实验间隔半小时以上，避免交叉污染。*