



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）。

【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。

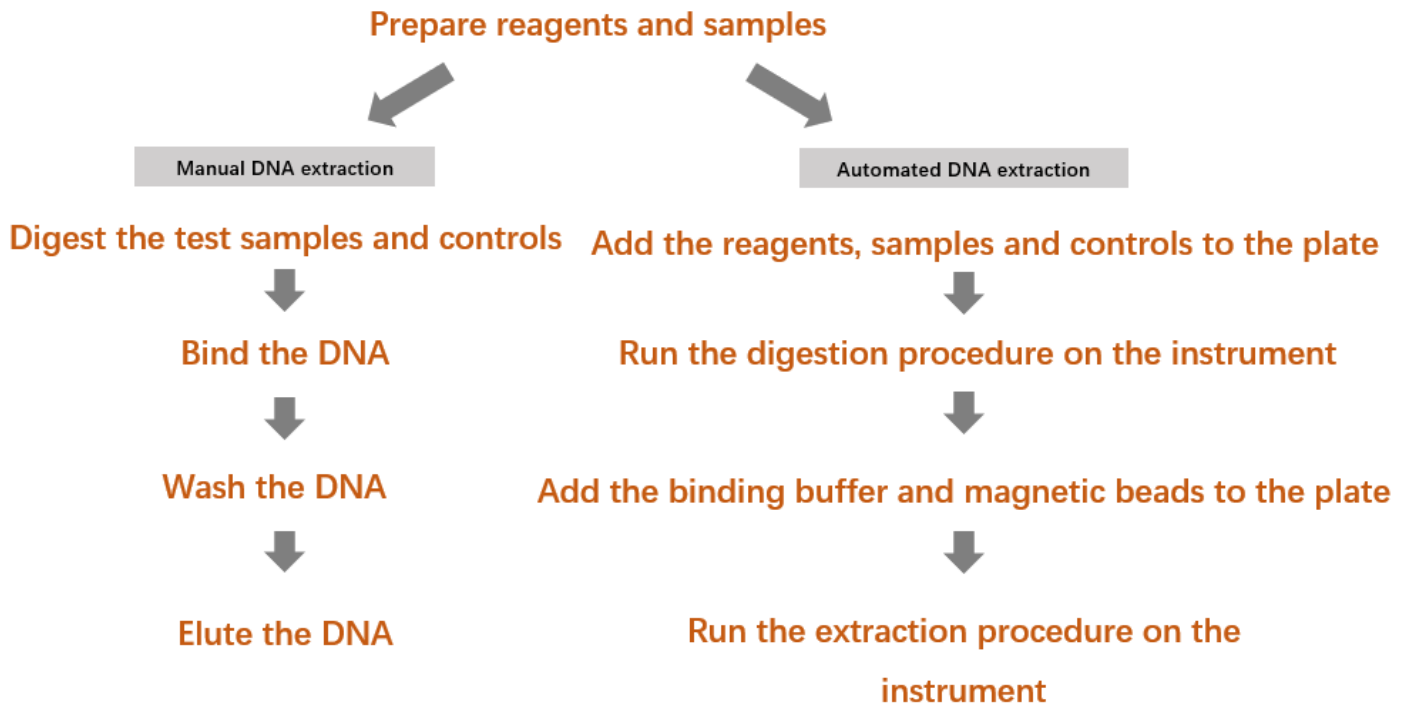
组分	装量	储存条件
裂解结合液 AL (Buffer AL)	35 mL	常温 10~30°C 储存; 更优条件为: 蛋白酶 K 和磁珠悬浮液 MB 存放于 2~8°C。
蛋白酶 K (Proteinase K)	4 mL	
磁珠悬浮液 MB (MagBeads Suspension)	1.4 mL	
助沉剂 CR (CR Powder)	310 µg	
洗液 WA (Buffer WA)	38 mL	
洗液 WB (Buffer WB)	18 mL	
洗脱液 MEB (Buffer MEB)	4 mL	
稀释液 (Sample Dilution Buffer)	5 mL	

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 ₂ 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 μg 助沉剂 CR Powder 管瞬时离心，加入 310 μL DNase/RNase-free ddH₂O，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 μL ，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 μL 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 μL 时可使用**稀释液** Sample Dilution Buffer 或 0.9% 无菌 NaCl（**客户自备**）补足至 200 μL ）。
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 μL ；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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L 磁珠悬浮液 MagBeads Suspension（**吸取前需充分涡旋混匀**）、3 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

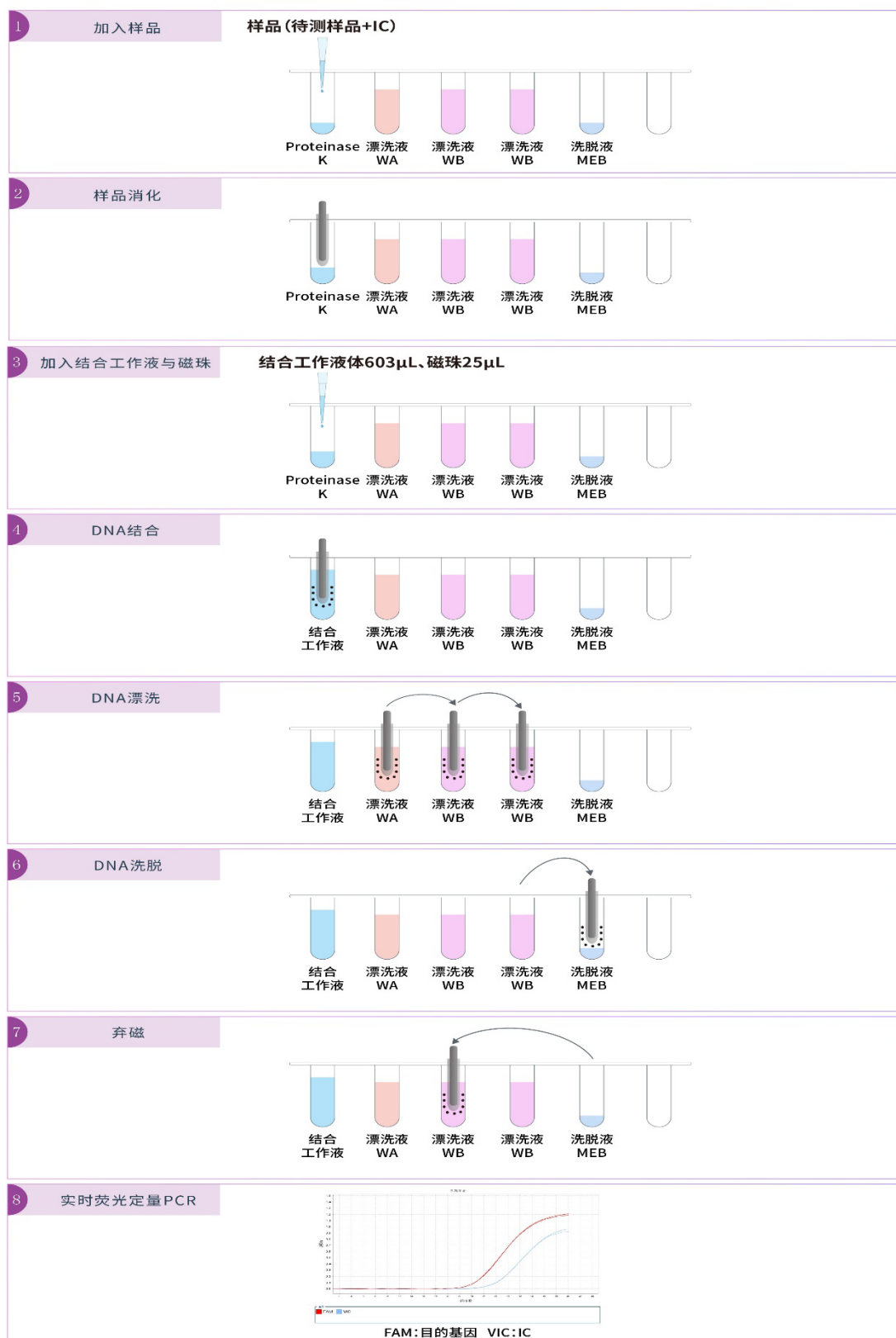
1. 加入 70 μ L Buffer MEB，用移液器轻轻吹打或涡旋振荡混匀 15~20sec 重悬磁珠，将离心管置于恒温混匀仪上 80 $^{\circ}$ C，1000 rpm 孵育 10min（若无恒温混匀仪，可使用恒温水浴锅进行孵育，孵育期间每 2~3 分钟涡旋混匀 1 次）；
2. 瞬时离心 15sec，将离心管静置于磁力架上，静置 1~3min 直至磁珠完全吸附，待溶液澄清用移液器小心吸取上清至新的 1.5 mL 低吸附离心管中进行保存（**请避免吸到磁珠**）；洗脱后的 DNA 可用于下一步 qPCR 检测。

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。

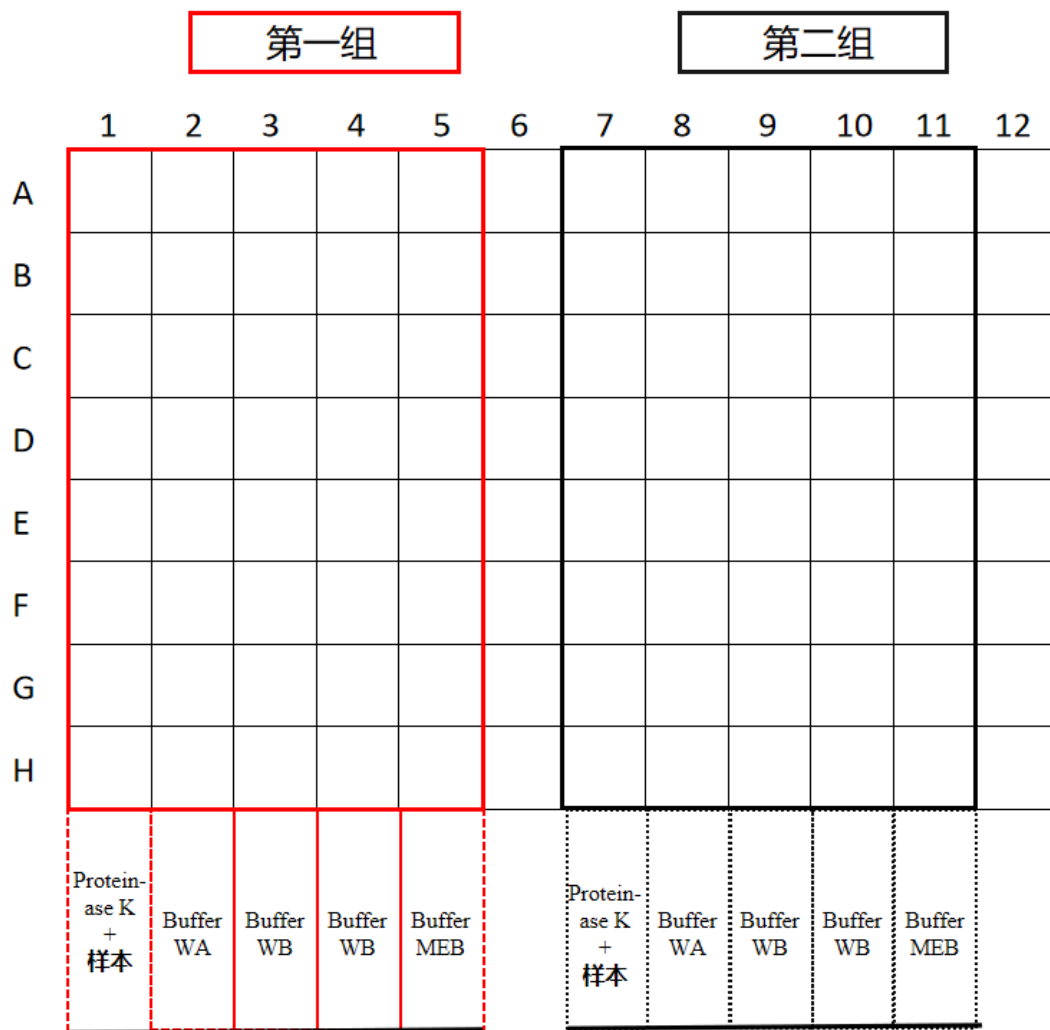


*结合工作液: Buffer AL 600μL+CR Solution 3μL
*IC: 内部质控 DNA (Internal Control DNA), 每个提取样品 (包括所有待测样品、阴性提取对照和阳性提取对照) 中加入7μL。

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 μ L Proteinase K。
3. 在深孔板第 2 或者第 8 列加入 Buffer WA 800 μ L。
4. 在深孔板第 3 或者第 9 列加入 Buffer WB 800 μ L。

5. 在深孔板第 4 或者第 10 列加入 Buffer WB 800 μL 。
6. 在深孔板第 5 或者第 11 列加入 Buffer MEB 70 μL 。

样品消化

1. 取 207 μL 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 μL +CR Solution 3 μL 共计 603 μL 。配置方法如下：

Kit Reagents	Volume for 1 sample	Volume for Binding Buffer
Buffer AL	600 μL	600 $\mu\text{L} \times N$
CR Solution	3 μL	3 $\mu\text{L} \times N$
Total	603 μL	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 μL 结合工作液，后加入 MagBeads Suspension 25 μL 。

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。