核酸提取或纯化试剂使用说明书

【产品名称】

通用名称：粪便、尿液核酸提取试剂盒

英文名称：SurbioPure Stool&Urine DNA extraction kit

【包装规格】64 份/盒、96 份/盒

【预期用途】

本试剂盒是专门从粪便、肛拭子、尿液等样品中病毒、细菌 DNA 以及宿主 DNA 的提取和纯化而设计的。试剂盒采用磁珠法纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种拭子、粪便、尿液病毒和细菌微生物宏基因组的筛查及 NGS 检测。目前广泛应用的例子：粪便，尿液，肛拭子等，试剂盒能够从此类样品中提取高产量高纯度的总 DNA。

【实验原理】

试剂盒是采用高结合力的纳米磁珠为基质。磁珠在高浓度离子化剂（如盐酸胍或异硫氰酸胍）条件下，可通过氢键和静电等物理因素吸附核酸而形成磁珠核酸复合物，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的磁珠经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液（如 Buffer TE）或水，洗脱出纳米磁珠上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。此外，**S3-抑制物清除剂**溶液是我们独创的腐殖酸吸附剂，该吸附剂可选择性吸附 DNA 样品中的腐殖酸等抑制因子，提高 DNA 纯度。

【主要组成成分】

试剂盒组成	Sup1116-64	Sup1116-96	Sup1116-Kingfisher Flex
纯化次数	64 次	96 次	96 次
S1-裂解液	100ml	100 ml	100 ml
S2-裂解增强剂	10 ml	10 ml	10 ml
S3-抑制物清除剂	45 ml	45 ml	45 ml
研磨管	64 个	96 个	96 个
16 次预分装板	4 块	6 块	6 块
磁套	8 条	12 条	1×96 kingfisher Tip
说明书		1 份	

【储存条件及有效期】

室温保存，保存得当可稳定使用 12 个月。

【注意事项】

- 1、**S2-裂解增强剂**使用前请先将其 65℃ 抚育至透明溶解状态，该溶液浓度高程粘稠状，注意移液器慢吸快放，保证液体的用量。
- 2、不同批次、不同组分试剂不能混用。

【适用机型】

广州赛百纯生物科技有限公司 MyPure-32 或 Kingfisher flex 等机型

【样品要求】

1. 适用样品类型：粪便、尿液等样品。
2. 样品保存：可立刻进行提取，也可以于 4℃ 保存待测，保存期不超过 8 小时，长期储存保存需置于 -20℃。

【使用方法】

以广州赛百纯生物科技有限公司 MyPure32 全自动核酸提取仪为例：

1、样品处理

1.1 粪便

取<0.25 g 此类样本加入研磨管中，加入 750 μ l **S1-裂解液**涡旋彻底、混匀。

1.2 尿液

使用负压设备，配合抽滤装置抽滤 50ml~200mL 的尿液（推荐使用 0.22 μ m 的微孔过滤器配合注射器进行过滤 50ml 的尿液），将微孔过滤器中的滤膜取出，用剪刀剪碎放入研磨管中，加入 750 μ l **S1-裂解液**涡旋彻底、混匀。

（过滤器推荐使用 0.22 μ m，配合 50ml 注射器完成样本的富集）

2.加入 100 μ l **S2-裂解增强剂**溶液至样品中，65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

3.剧烈涡旋震荡 10min。

（此步骤可选用研磨仪 Tissue lyser II，频率：6.5 m/sec ，处理时间：30S，10 个循环）

4. 12000 rpm 离心 5 min，转移上清 400 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。

（注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增）

5. 加入 250 μ l **S3-抑制物清除剂**，立即彻底混匀。

6. 12000 rpm 离心 2 min，转移全部上清液（约 400 μ l）到预分装板的孔(1、7)中。打开核酸自动提取仪，选择编辑程序并命名“Stool&Urine DNA”，按照下表进行编辑。

运行	流程库	编辑	选项	关机	关于												
Kit NO.111601-2		名称: stool &urine DNA Pro															
步骤	孔位	液量 (uL)	浸泡 (秒)	搅拌强度(级)	搅拌时间 (秒)	下降吸磁(秒)	液底吸磁(秒)	吸磁次数(次)	等待 (秒)	暂停 关/开	板1裂1 (°C)	板1裂2 (°C)	板1脱 (°C)	板2裂1 (°C)	板2裂2 (°C)	板2脱 (°C)	风扇 关/开
1-99	1-6	20~1000	0~255	1~6	0~9999	5~600	0~255	0~255	0~9999	0/1	0~125	0~125	0~125	0~125	0~125	0~125	0/1
1	1	900	0	4	600	30	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	200	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	1000	0	5	60	30	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	200	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3	1000	0	5	60	30	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	200	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4	1000	0	5	60	30	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	5	200	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	5	1000	0	5	60	30	3	2	180	0	0	0	0	0	0	0	0
10	6	100	0	3	240	5	5	5	0	0	0	0	65	0	0	65	0
11	5	1000	0	5	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7. 插入磁棒套，运行编辑好的程序，25min 左右程序结束，转移洗脱孔 6、12 中的 DNA 至新的离心管-20 $^{\circ}$ C 保存或直接进入 q-PCR 检测。

以赛默飞世尔（中国）科学生产的 **KingFisher Flex** 为例：

打开试剂盒后，检查试剂盒内组分，小心撕开铝箔封口膜，将板子准备好后待用。

Plate ID	Plate type	Reagent	Volume per well
Binding Plate	Deep-well	S4-Binding Buffer	500 μ L
Wash 1 Plate	Deep-well	S5-Wash Buffer1	1,000 μ L+Tip
Wash 2 Plate	Deep-well	S5-Wash Buffer1	1,000 μ L
Wash 3 Plate	Deep-well	S6-Wash Buffer2	1,000 μ L
Wash 4 Plate	Deep-well	S6-Wash Buffer2	1,000 μ L
Elution Plate	Standard-well	Elution Solution	100 μ L

1、按照下表，根据样本的量加入适量的 **S1-裂解液**到**研磨管**中，按照实验室的常规操作，将样本转移到**研磨管**中，涡旋彻底、混匀。

样品类型	样本量	Volume S1-裂解液
人及其他大型动物粪便	0.2g $\pm$ 0.05g	750 μ l
老鼠及其他小型动物粪便	0.1g $\pm$ 0.05g	800 μ l

2、加入 100 μ l **S2-裂解增强剂**，涡旋振荡器开到最高频率，剧烈涡旋震荡 1 min。

3、65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

4、剧烈涡旋震荡 10min。

（此步骤可选用研磨仪，频率：6.5 m/sec ，处理时间：30S，10 个循环）

5、14000 rpm 离心 5 min，转移上清 400 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。

（注意：离心后上清表面可能出现一层杂质，避免吸取这些杂质，因为这些杂质会影响下游的扩增）

6、加入 250 μ l **S3-抑制物清除剂**，立即彻底混匀。

（加入 **S3** 后，根据实验的情况，可选择冰上孵育 **10 min**，可以最大限度的去除抑制剂）

7、14000 rpm 离心 2 min，转移全部上清液（约 400 μ l）到 Binding Plate。

8、运行程序“111601Stool&Urine Kit”，按照仪器提示：依次放入准备好的试剂板（见上表）

9、程序结束后，将 Elution Plate 内的 DNA 转移到无 DNase &RNase 的离心管中，-20 $^{\circ}$ C 储存或直接用于下游实验。

【检验结果的判定】

DNA 纯度：OD260/OD280≈1.7~2.0 (>2.0，表明有 RNA 污染；<1.7，表明有蛋白质、酚等污染)

【产品性能指标】

1. 本产品批内、批间差异<5%。
2. 利用仪器提取时，可同时提取 1-32 个样本，结果稳定且重复性好。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 不同型号的核酸提取仪由于硬件的关系可能需设置不同的提取程序，详细参数设置可以咨询本公司。
3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
4. 试剂盒中组分需在效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果；
5. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
6. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA/RNA 酶的离心管和吸头；
7. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20℃待用(24 小时内)；
8. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器,然后用紫外线灯照射 20~30 分钟。

【参考文献】

1. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E.W. Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.
2. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

【生产企业基本信息】

医疗器械备案号：粤穗械备 20210406 号

医疗器械生产备案号：粤穗食药监械生产备案 20200109 号

生产企业：广州赛百纯生物科技有限公司

地址：广州市黄浦区瑞发路 12 号自编三栋第四层 401 单元

服务热线：18926136067

邮编：510700

网址：<http://www.surbiopure.com>