

# 病原微生物核酸提取试剂说明书

版本号：23JL10

## 【产品名称】

病原微生物核酸提取试剂

## 【包装规格】

48 人份/盒

## 【货号】

ATT01-05

## 【预期用途】

用于肺泡灌洗液、胸水、痰液、血液、脑脊液、拭子等样本中核酸（DNA 和 RNA）的提取，其处理后的产物可用于病原微生物基因的检测。

## 【预期用途】

病原微生物核酸提取试剂基于高结合力的纳米磁珠的纯化方式。收集的临床样本通过捣珠和组织消化液进行组织和细胞壁破碎，再通过裂解液和蛋白酶 K 溶液的作用进行细胞裂解和蛋白质消化。加入纳米磁珠吸附核酸（DNA 和 RNA），而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了核酸的粒子经清洗液洗涤去除蛋白质和其它杂质，最后核酸被洗脱缓冲液洗脱。洗脱后的核酸（DNA 和 RNA）可直接用于后续检测。

## 【主要组成成分】

试剂盒	产品组成	规格	数量
试剂盒 1	组织消化液	10mL/瓶	1 瓶
	裂解液	10mL/瓶	1 瓶
	洗涤液 1	54mL/瓶	1 瓶
	洗涤液 2	20mL/瓶	1 瓶
	核酸保护剂 S	0.5mL	3 管
	蛋白酶 K	750 $\mu$ L/管	2 管
	DNA 磁珠	1.5mL/管	1 管
	无核酸酶水	15mL/瓶	1 瓶
	研磨管	1 样本/管	48 管
试剂盒 2	辅助剂 R	750 $\mu$ L/管	1 管

注：不同批次之间试剂组分不可混用。

## 【储存条件及有效期】

试剂盒 1 于常温（15~25℃）保存，试剂盒 2 于-25℃~-15℃以下温度保存；有效期均为 12 个月。

## 【自备材料】

1. 设备：生物安全柜、破壁震荡仪、高速离心机、掌上离心机、漩涡振荡器、磁力架、颠倒混匀仪、Qubit 荧光定量仪、恒温混匀仪或同等功能仪器、移液器等。
2. 试剂：Qubit™ dsDNA HS Assay kit、Qubit™ RNA HS Assay kit 、1.5mL 离心管（无 DNase）、无水乙醇、异丙醇、无核酸酶水、液化剂（推荐品牌：福州奥吉芯生物科技有限公司）、全能核酸清除剂（推荐品牌：福州新创元生物科技有限公司）。
3. 耗材：滤芯吸头、1.5mL 低吸附离心管、Qubit 定量管或适配的 0.5mL 离心管。

## 【样本要求】

1. 样本采集：参照临床检验样本采集指南采集肺泡灌洗液、痰液、血液、脑脊液等，无菌操作，采集后的样本置于无菌管中。样本在采集、保存和转移时避免污染。
2. 样本保存与运输：样本采集后，建议 12 小时内进行检测；如果不能及时检测，则置于-18℃及以下保存，在 1 个月内完成检测；样本长期保存则置于-70℃以下，1 年内有效。样本采用干冰运输。冻融次数应不超过 3 次。冷冻样本检测前应将样本置于室温融化，并充分混匀后使用。
3. 核酸的保存：提取的核酸，应立即进行文库制备，如果不能及时检测，则置于 2℃~8℃保存，12 小时内进行文库制备，或置于-18℃及以下温度保存；文库制备完成后应立即进行测序，如果不能及时测序，则置于-18℃及以下温度保存，30 天内完成检测。
4. 样本安全性：所有样本均视为有潜在感染性的物品，操作时按国家相关标准执行。

## 【操作步骤】

### 1. 样本前处理

#### 1.1 痰液

针对痰液和存在粘稠物的肺泡灌洗液需在提取前进行液化处理。

若采用福州奥吉芯生物科技有限公司生产的样本液化剂，则按如下步骤进行：

（1）根据需要液化的样本数 N 按照 N+2 的反应数量来配制液化液。取 A 液、B 液，按体积比 1:1 配制 AB 混合液。

（2）根据待液化样本量，按样本 : AB 混合液 = 1 : 1.5 的比例（样本一般取 500μL），往离心管中依次加入样本和 AB 混合液。

（3）用封口膜缠住管盖，离心管平放并固定于震荡仪上，以最高速震荡 10~30min，至粘稠物完全呈流动状（吸液时不堵塞吸头）。

#### 1.2 其它样本不需要额外预处理

**注：**血液、脑脊液、胸水、不粘稠肺泡灌洗液等直接按要求体积取样进行提取。

## 2. 试剂准备

(1) 试剂盒开封时，按试剂瓶上的标识，向洗涤液 1 和洗涤液 2 加入相应体积的无水乙醇并混匀，在瓶盖、瓶身上标记配置时间。

(2) 若实验室温度过低，需预先将组织消化液和裂解液放置于 37°C 金属浴上，使结晶充分溶解。

(3) 将无核酸酶水放置于 56°C 金属浴上预热。

(4) Qubit 定量试剂应提前至少 30min 从 4°C 取出，平衡至室温。

## 3. 检测流程

3.1 取 2mL 研磨管，取 500  $\mu$ L 样本，加入 15 $\mu$ L 辅助剂 R，混匀后置于破碎仪上，最大转速震荡 10min（组织样本可根据破碎效果增加 5-10 min），瞬时离心。

3.2 取 1.5mL 离心管，依次加入 150  $\mu$ L 组织消化液、150  $\mu$ L 裂解液和 30  $\mu$ L 核酸保护剂 S 并混匀，然后加入 20  $\mu$ L 蛋白酶 K。从步骤 3.1 中的研磨管中吸出 300 $\mu$ L 上清液加入该离心管中，涡旋混匀，瞬时离心，室温放置 10 min。

3.3 向上步骤的离心管中加入 350  $\mu$ L 异丙醇和 15  $\mu$ L DNA 磁珠，涡旋混匀。

3.4 置于颠倒混匀仪上混匀 10 min。

3.5 瞬时离心，置于磁力架直至溶液澄清，弃上清，离心管移出磁力架。

3.6 向离心管中加入 750  $\mu$ L 洗涤液 1（确保已加入无水乙醇），充分振荡，使磁珠处于混匀状态 2 min。

3.7 瞬时离心，置于磁力架直至溶液澄清，弃上清，离心管移出磁力架。

3.8 向离心管中加入 750  $\mu$ L 洗涤液 1，充分振荡，使磁珠处于混匀状态 2 min。

3.9 瞬时离心，置于磁力架直至溶液澄清，弃上清，离心管移出磁力架。

3.10 向离心管中加入 750  $\mu$ L 洗涤液 2（确保已加入无水乙醇），充分震荡，使磁珠处于混匀状态 2 min。

3.11 瞬时离心，置于磁力架直至溶液澄清，弃上清，离心管移出磁力架。

3.12 向离心管中加入 750  $\mu$ L 洗涤液 2，充分震荡，使磁珠处于混匀状态 2 min。

3.13 瞬时离心，置于磁力架直至溶液澄清，弃上清，离心管移出磁力架。

3.14 瞬时离心，置于磁力架上用 10  $\mu$ L 移液器吸弃残液，50 °C 开盖干燥磁珠至磁珠表面无光泽。

3.15 向离心管中加入 65  $\mu$ L 无核酸酶水，涡旋混匀，置于恒温混匀仪上 56 °C/1000 rpm/5 min（期间观察磁珠是否为混匀状态，若磁珠沉底，轻弹管底，快速混匀后立即放回）。

3.16 离心管置于磁力架至溶液澄清，将洗脱液转移到新的 1.5 mL 离心管中，管盖上标明编号、日期。

3.17 实验结束后，采用全能核酸清除剂对实验室进行核酸清除。

## 4. 核酸质检

4.1 DNA 浓度测定：用 Qubit™ dsDNA HS Assay kit 测定 DNA 浓度。

4.2 RNA 浓度测定：用 Qubit™ RNA HS Assay kit 测定 RNA 浓度。

### 【检验结果的解释】

1. 对于提取的 DNA 产量：非脑脊液样本，DNA 浓度应大于 0.1ng/μL，产量应大于 0.5ng；对于脑脊液样本，无浓度要求。

2. 对于提取的 RNA 产量：非脑脊液样本，RNA 浓度应大于 0.1ng/μL，产量应大于 0.5ng；对于脑脊液样本，无浓度要求。

3. 以下情况可能会影响提取产量，应排除影响后再进行实验：

- (1) 如痰液样本、粘稠肺泡灌洗液样本应先进行液化再进行核酸提取，可根据情况适当增加研磨珠震荡时间。
- (2) 脑脊液样本可减少研磨珠震荡时间至 5min，或不震荡，直接进行后续操作。
- (3) 若提取过程出现磁珠结块现象，可能由于样本过于粘稠或核酸浓度高导致，可根据结块情况适当补充磁珠（5-10μL 磁珠）。
- (4) 洗涤液 1 和洗涤液 2 需按照说明书及标签所示加入正确量的无水乙醇。试剂配制错误会影响提取产量。
- (5) 一些操作错误可能导致试验结果的不合格，比如：试剂在有效期外使用、加样器不准确、室内温度过高、未按说明书提取程序进行试验等。

### 【检验方法的局限性】

本试剂盒仅适用于肺泡灌洗液、胸水、痰液、血液、脑脊液、拭子等样本的核酸提取，用于病原微生物的检测，不适用于其他用途的核酸提取。

### 【注意事项】

1. 本产品仅共科研使用，使用前请仔细阅读本说明书；
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项；
3. 所有样本前处理及样本提取均需在生物安全柜中进行，并严格按相关实验室规定进行操作。
4. 建议每次实验完，使用全能核酸清除剂对实验室进行核酸清除。
5. 所有试剂从规定的存储环境中取出时，按照要求使用，使用前试剂应摇匀，混匀后使用；
6. 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；
7. 所有样本和各种废弃物均应视为污染物，按相关法规规定处理。

**【基本信息】**

生产企业名称：福州奥吉芯生物科技有限公司

住所：福建省福州市闽侯县南屿镇尧溪路3号福建省电子信息集团科学工业园二号厂房4层西侧401

电话：0591-85666335

邮编：350100