

FastPure Microbiome DNA Kit Handbook

FastPure 无背景微生物基因组提取试剂盒说明书（离心柱型）

产品组成

FastPure Microbiome DNA Kit			
产品编号	EK-1220-50T	EK-1220-100T	EK-1220-250T
纯化次数	50 次	100 次	250 次
Buffer AHL	30ml	60ml	150ml
Buffer RDD	12ml	24ml	60ml
Buffer ATL	12ml	24ml	60ml
Buffer APL2	12ml	24ml	60ml
Buffer AW1	19ml	38ml	98ml
Buffer AW2	17ml	24ml	81ml
Proteinase K Solution (20mg/ml)	3.5ml	7ml	17.5ml
Buffer AVE	10ml	20ml	50ml
Benzonase	140µl	280µl	700µl
Pathogen Lysis Tube	50 个	100 个	250 个
2ml Collection Tubes	50 个	100 个	250 个
Nucleic Acid Spin Columns	50 个	100 个	250 个
使用手册	1	1	1

产品介绍

本产品适用于从拭子和体液中纯化和富集细菌微生物组 DNA 的专用解决方案。在纯化过程中有效去除宿主 DNA 可最大限度地提高下一代测序分析中的细菌 DNA 覆盖率，并允许基于 16S rDNA 的高灵

敏度微生物组分析和全宏基因组测序研究。

存储条件

Benzonase 和 Proteinase K 溶液保存时需置于-20°C，其余可在室温(15~25°C)保存 12 个月。

需要额外准备的材料

- PBS 或 0.9% NaCl (用于液体样本稀释)
- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无酶 1.5ml/2ml 离心管
- 无酶吸头
- 涡旋仪
- 高速离心机

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 可提取样品类型为：肺泡灌洗液、拭子和其他体液等富含宿主 DNA 样本
- 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的核酸片段较小且提取量下降。
- 若 Buffer ATL 或 Buffer APL2 中有沉淀，可在 56°C 水浴中加热溶解后使用。
- Buffer AW1 和 Buffer AW2 中提前加入无水乙醇

操作步骤:

1. 取 1ml 样品添加到 2 ml 试管中, 加入 500 μ l Buffer AHL 并在室温下旋转孵育 30 分钟。

注意: 也可以用 600rpm 左右速度震荡器孵育, 定期查看是否混匀完全, 若样本体积不够可使用 PBS 稀释至所需要体积。

2. 将管子在室温下以 10,000 \times g 离心 10 分钟, 然后小心地取出上清液并丢弃或用于其它提取, 保留沉淀为细菌样品使用。注意不要吸到下层颗粒, 因为这会导致细菌的丢失。

注意: 上清液若需要可保留用于病毒等的提取, 本试剂盒使用沉淀细菌进行核酸提取。

3. 向含有沉淀的离心管中添加 190 μ l Buffer RDD 和 2.5 μ l Benzonase。充分混匀并在加热块或水浴中以 600 rpm 的速度在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。

4. 加入 20 μ l Proteinase K Solution, 在加热块或水浴中以 600 rpm 的速度在 56 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。

5. 向管内加入 200 μ l Buffer ATL, 充分混匀后将全部液体加入 Pathogen Lysis Tube 中。

注意: 加入 Buffer ATL 后的充分混匀可确保完整细菌的有效转移。

6. 将含溶液的 Pathogen Lysis Tube 固定在涡旋器上以最大速度涡旋 10 分钟。

注意: 在裂解过程中避免加热样品。

7. 以 8000 \times g 将 Pathogen Lysis Tube 离心 1 分钟以减少裂解后的泡沫量。小心混合并将上清液转移到新的离心管中。

注意: 若部分离心机不兼容 Pathogen Lysis Tube, 可将所有移入到尖底或圆底 1.5ml 离心管中后再离心。离心步骤后仔细混合将转移管底部可能完整的细菌(若底部有明显细菌沉淀可一并随液体吸出移入新离心管中)。不要将珠子从 Pathogen Lysis Tube 转移到后续反应中。

8. 向上述含溶液的离心管中加入 40 μ l Proteinase K Solution, 涡旋混合, 然后在加热块或水浴中以 600 rpm 的速度在 56 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。

9. 加入 200 μ l Buffer APL2, 充分涡旋混合 30 秒。

10. 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟并短暂旋转试管将管壁液滴甩下。

11. 向裂解液中加入 200 μ l 无水乙醇, 充分涡旋混合 15-30 秒。

12. 将 1.5ml 离心管短暂离心以除去盖子内的液滴, 将步骤 11 中的裂解液转移到已安装收集管的核酸吸附柱中, 不要弄湿边缘并盖上盖子。

注意: 若步骤 11 中总溶液体积超过 700 μ l 则分次上柱。

13. 以 8000 \times g 离心 1min。弃滤液, 将核酸吸附柱重新放回 2 ml 收集管中。

注意: 如果离心后裂解液没有完全通过核酸柱, 再次以更高的速度(最高 20,000 \times g; 14,000 rpm)离心, 直到吸附柱中变空。

14. 打开核酸吸附柱, 加入 600 μ l Buffer AW1, 不要弄湿边缘, 盖上盖子。

注意: 确保在使用前将无水乙醇添加到 Buffer AW1 中。

15. 以 8000 \times g 离心 1min。弃滤液, 将核酸吸附柱重新放回 2 ml 收集管中。

16. 打开核酸吸附柱, 加入 600 μ l Buffer AW2, 不要弄湿边缘, 盖上盖子。

注意: 确保在使用前将无水乙醇添加到 Buffer AW2 中。

17. 以 8000 \times g 离心 1min。弃滤液, 将核酸吸附柱重新放回 2 ml 收集管中。

18. 重复操作步骤 17 一次。

19. 最大转速 (~13,400 \times g)离心以除尽 Buffer AW2 以干燥吸附柱膜。将吸附柱套入新的 1.5ml 无酶离心管中并置于室温放置 5-10min 彻底晾干乙醇。

20. 向吸附柱膜中间位置悬空滴加 50 μ l Buffer AVE (或无酶水), 室温静置 2min 后, 最大转速 (~13,400 \times g)离心 2min 收集核酸溶液。丢弃柱子, 盖上离心管盖子置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 洗脱体积不应小于 30 μ l, 体积过少影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。为了提高核酸的回收量, 可将离心得到的溶液重新加回离心吸附柱中按步骤 19 要求离心, 将核酸溶液收集到离心管中。