

Upure Microbiome Extraction Kit (M2028)

微生物核酸自动化提取操作流程

适配 Allsheng Auto-Pure 32A

实验前准备工作：

1. 自动化提取仪：使用前可进行紫外消毒。

2. Buffer 检查：

Buffer LWB 需避光保存。

Buffer LWB 低温易结晶，使用前请确定 **Buffer LWB** 没有晶体析出，若有晶体析出可 37°C 温浴使析出的晶体复溶。

3. 预分装试剂盒检查：使用前检查磁珠是否粘在封口膜上，若出现此类情况可将试剂预分装板上下摇晃混匀后静置几分钟，或于离心机短暂离心后使用。

一、样本预处理

1. 样本处理

1.1 干拭子、粪便样本：取干拭子或 ≤50mg 的粪便样本至裂解管(**Lysis Tube**)中，加入 20 μL 蛋白酶 K(**Proteinase K**)和 450 μL 裂解液(**Buffer GS**)。

1.2. 全血、含保存液的拭子样本：取 200 μL 全血或拭子样本处理液至裂解管(**Lysis Tube**)中，加入 20 μL 蛋白酶 K(**Proteinase K**)和 200 μL 裂解液(**Buffer GS**)。

1.3. 痰液等液体样本：取适量液化痰液样本等液体样本至新的离心管中，12000rpm 离心 10min，弃上清。加入 20 μL 蛋白酶 K(**Proteinase K**)和 300 μL 裂解液(**Buffer GS**)，涡旋混匀，将混合液转移至裂解管(**Lysis Tube**)。

2. 使用破碎仪推荐程序破碎细胞，例如宁波新芝高通量组织研磨器 60Hz，3min (1800rpm，3min)。

注意：该步骤将产生大量泡沫，不影响微生物核酸的提取效率。

3. 56°C 孵育 10min。

4. 12000rpm 离心 3min，使用移液器小心吸取 ≤300 μL 上清至提取板对应孔位中。

注意：吸取上清时不要吸入研磨珠及沉淀。如吸入沉淀，可将吸取的上清 12000rpm 再离心 1min 后吸取上清提取。

二、自动化提取

1. 取 96 孔板，按照下表 1 加入样本和试剂至深孔板中。若为盒装试剂盒，以下试剂都需自行加入。

注意：每一孔的总体积不能超过 900 μL，否则可能溢出。

表 1. 96 孔板设置及试剂用量

孔位	预处理液/试剂	体积(μL)	预分装版说明	试剂说明
第 1 列/第 7 列	裂解结合液 Buffer LND 工作液	600	已分装，不需用户加入。	若有结晶，需温浴使析出的晶体复溶后再使用。
	样本预处理液	≤300	需用户自行加入。	—
第 2 列/第 8 列	清洗缓冲液 1 Buffer WE 工作液	600	已分装，不需用户加入。	若有结晶，需温浴使析出的晶体复溶后再使用。
第 3 列/第 9 列	清洗缓冲液 2 Buffer WB	600	已分装，不需用户加入。	—
第 4 列/第 10 列	磁珠 Microbiome Beads	30	已分装，不需用户加入。	磁珠若未分装，使用前需充分混匀重悬。
	清洗缓冲液 3 Buffer SPW 工作液	600	已分装，不需用户加入。	—
第 5 列/第 11 列	清洗缓冲液 3 Buffer SPW 工作液	600	已分装，不需用户加入。	—
第 6 列/第 12 列	Buffer TE	80	已分装，不需用户加入。	洗脱体积可根据具体要求调整。 至少加入 60μl 的 Buffer TE 进行洗脱。

2. 启动仪器，在仪器中放置好新的洁净磁棒套（**切记更换新的磁棒套，否则会造成样本交叉污染**），并将装有样品和试剂的深孔板放到仪器中，与磁棒套相对应。
- 注意：****切记放置磁棒套，否则溶液会腐蚀磁棒，影响仪器性能和后续实验。**
3. 执行程序（表 2）。
4. 收集产物：取出 96 孔板和磁棒套，吸取第 6/12 列中的提取产物至干净的 EP 管中，检测后于-20℃或-80℃保存。

表 2. Allsheng Auto-Pure 32A 提取程序设置（吸磁选项设置为“**往复吸磁**”）

孔位	步骤名称	混合时间 (min)	吸磁时间 (sec)	等待时间 (min)	容积 (μl)	混合速度 (1-10)	温度 (°C)	混合位置 (1-100%)	混合幅度 (1-100%)	吸磁位置 (1-100%)	吸磁速度(1-10)
4	Collect	0.2	60	0	600	8	OFF	0	80	0	1
1	Binding	15	90	0	900	8	OFF	0	80	0	1
2	Wash 1	3	60	0	600	8	OFF	0	80	0	1
3	Wash 2	2	90	0	600	8	OFF	0	80	0	1
4	Wash 3	2	60	0	600	8	OFF	0	80	0	1
5	Wash 4	1	60	5	600	8	OFF	0	80	0	1
6	Elution	5	120	0	80	8	65	0	80	0	1
5	Drop	0.2	0	0	600	8	OFF	0	80	0	1

如果上述方法均不能解决您的问题，请联系我们技术支持部门。