



核酸提取或纯化试剂 说明书

【产品名称】

核酸提取或纯化试剂

【包装规格】

型号 I：50次/盒、400次/盒

型号 II：24次/盒、96次/盒

【预期用途】

主要用于核酸提取、富集、纯化步骤。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒提供了一种从全血、血清、血浆、肺泡灌洗液中提取DNA的方法。独特的缓冲体系使富集的核酸浓度高，质量稳定，不含蛋白、核酸酶和其他杂质，可适用于各种常规操作。

【主要组成成分】

型号I:

试剂名称	主要成分	50次/盒		400次/盒	
		规格	数量	规格	数量
裂解缓冲液	异硫氰酸胍	12 mL/瓶	1瓶	96 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	盐酸胍	20 mL/瓶	1瓶	80 mL/瓶	2瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	三羟甲基氨基甲烷	28 mL/瓶	1瓶	56 mL/瓶	4瓶
洗脱缓冲液	无RNA酶水	12 mL/瓶	1瓶	96 mL/瓶	1瓶
磁珠悬浮液	磁珠	1 mL/支	1支	8 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	酶	25 mg/支	1支	180 mg/瓶	1瓶
蛋白酶K保存液	甘油	1.25 mL/支	1支	5 mL/支	2支

型号II:

试剂名称	主要成分	24次/盒		96次/盒	
		规格	数量	规格	数量
预处理缓冲液1	氯化钾	48 μ L/管	1管	192 μ L/管	1管
预处理缓冲液2	氯化钠	200 μ L/管	1管	800 μ L/管	1管
纯化缓冲液 1	氯化镁	48 μ L/管	1管	192 μ L/管	1管
纯化缓冲液 2	乙二胺四乙酸	400 μ L/管	1管	800 μ L/管	2管
富集缓冲液	三羟甲基氨基甲烷	600 μ L/管	1管	1.2 mL/管	2管

【储存条件及有效期】

型号 I: 4-30°C保存, 有效期12个月, 可在4-37°C运输, 运输时间建议不超过7天。

型号 II: -20°C保存, 12个月, 干冰运输。

【样本类型】

全血、血清、血浆、肺泡灌洗液。

【检验方法】

型号 I:

1. 自备仪器、试剂

磁力架：建议使用DynaMagTM-2 (Cat.No. 12321D)。

无水乙醇，异丙醇。

Thermomixer：建议使用Thermo Fisher生产的Thermomixer。

2. 实验前准备：向蛋白酶K中加入指定用量的蛋白酶K保存液使其溶解，终浓度为20mg/mL，-20℃保存。

	50次/盒	400次/盒
蛋白酶K保存液	加入1.25 mL	加入9 mL

3. 向1.5 mL离心管中加入13 μ L蛋白酶K溶液、200 μ L血清/血浆样品、190 μ L裂解缓冲液、130 μ L异丙醇和17 μ L磁珠悬浮液涡旋振荡5秒钟使其充分混匀。

注：

1) 冻存样品需提前在4℃冰箱中放置使其溶化。溶化过程中反复颠倒样品储存管使其混匀。

2) 如果样品体积大于或小于200 μ L，裂解缓冲液、异丙醇和磁珠悬浮液的用量需按比例进行调整，且磁珠悬浮液的用量不应小于10 μ L。

3) 裂解产物与异丙醇的充分混匀对于游离DNA的提取至关重要。

4) 用移液器吸取异丙醇时，枪头需在异丙醇中吹吸两次后再缓慢吸取异丙醇。

4. 将离心管放于56℃、1200rpm的Thermomixer上振荡裂解10分钟。

注：

1) 如无Thermomixer，需将离心管放于56℃水浴锅或金属浴中孵育10分钟，期间每隔2分钟涡旋振荡5秒钟。

2) 如无Thermomixer，可将离心管连续颠倒混匀10分钟。

5. 将上一步的离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠完全吸附于离心管的侧壁上时彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上），期间避免接触磁珠。

6. 向离心管中加入500 μ L漂洗缓冲液1（加入前检测是否加入无水乙醇）后，将离心管从磁力架上取下，涡旋震荡5秒钟后放于25℃、1600 rpm的Thermomixer上振荡2分钟。

注：如无Thermomixer，可将离心管涡旋振荡10秒钟使磁珠充分悬浮于漂洗液中。

7. 将上一步的离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠完全吸附于离心管的侧壁上后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上），期间避免接触磁珠。

注：弃去溶液时，如离心管盖上有残留溶液，需用移液器进一步去除。

8. 向离心管中加入500 μ L漂洗缓冲液2（加入前检测是否加入无水乙醇），将离心管从磁力架上取下，涡旋震荡5秒钟后放于25 $^{\circ}$ C、1600 rpm的Thermomixer上振荡2分钟。

注：如无Thermomixer，可将离心管涡旋振荡10秒钟使磁珠充分悬浮于漂洗液中。

9. 将上一步的离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠完全吸附于离心管的侧壁上后轻轻颠倒磁力架将离心管盖上的杂质洗落后彻底弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上），期间避免接触磁珠。

注：弃去溶液时，如离心管盖上有残留溶液，需用移液器进一步去除。

10. 重复步骤8-9。

11. 将离心管从磁力架上取下短暂离心，之后将离心管重新放于磁力架上，用移液器进一步去除管底溶液。

12. 保持离心管固定于磁力架上室温放置5-10分钟，使乙醇挥发干净。

13. 向离心管中加入30-100 μ L洗脱缓冲液，将离心管从磁力架上取下，涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中后将其放于56 $^{\circ}$ C、1600 rpm的Thermomixer上振荡洗脱10分钟。

注：

1) 通常，提高洗脱体积可以增加DNA得率，降低洗脱体积可以提高DNA浓度。建议根据后续实验的需求确定洗脱体积。

2) 如磁珠未能振荡至完全分散状态，会降低提取得率。

3) 如无Thermomixer，可将离心管放于65 $^{\circ}$ C水浴锅或金属浴中孵育15分钟，期间每隔2分钟涡旋振荡5秒钟。

14. 将上一步的离心管放置于磁力架上静置2分钟，待磁珠完全吸附后用移液器将洗脱液转移至新的离心管中-20 $^{\circ}$ C保存备用。

【注意事项】

1. 在试验前，应仔细阅读本说明。

2. 避免试剂的反复冻融，建议您首次使用试剂盒后将剩余试剂分装保存。

3. 磁珠悬浮液严禁冰冻、离心。冰冻和离心可能会对磁珠造成不可逆的损害。

4. 蛋白酶K溶液勿长时间室温放置并避免反复冻融，以免影响其活性。如需多次使用，可根据每次使用量将蛋白酶K进行分装。

5. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量低。
6. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在漂洗缓冲液2（浓缩液）和漂洗缓冲液3（浓缩液）中加入无水乙醇并做好标记。
7. 磁珠悬浮液在使用前一定要涡旋振荡20秒使其充分混匀。
8. 检验方法中使用Thermomixer震荡的目的是使磁珠充分悬浮于溶液中，以便使磁珠能充分吸附核酸，将吸附在磁珠表面的杂质充分去除或将核酸从磁珠表面充分洗脱。不同厂家生产的Thermomixer震荡效果不同，如1600 rpm时不能使磁珠充分混匀请调节震荡频率直至磁珠能充分混匀。

【检验方法】

型号 II:

1. 自备仪器、试剂和耗材

- 1.1 磁力架：建议使用DynaMagTM-2 (Cat.No. 12321D)。
- 1.2 无水乙醇，EB (10 mMTris-HCl, pH 8.0)，去离子水（pH 在7.0-8.0之间）。
- 1.3 反应管：建议使用低吸附的1.5 mL离心管；
枪头：建议使用高质量过滤枪头防止样本污染。

2. 样本预处理

取5-1000ng样本（样本片段分布为100-500bp），6.5 μ L预处理缓冲液2，2 μ L预处理缓冲液1，混合加入离心管中并补水至65 μ L体积，涡旋震荡5秒后，先12 $^{\circ}$ C反应15min、然后在37 $^{\circ}$ C反应15min，最后72 $^{\circ}$ C反应20min。

3. DNA片段的纯化回收

向上述预处理体系中加入14 μ L纯化缓冲液2、2 μ L纯化缓冲液1以及2.5 μ L oligo1(客户自备)，混匀后20 $^{\circ}$ C反应15min。

3.1 选择性回收

- 3.1.1 涡旋振荡磁珠20秒，使其彻底混匀为均一溶液。
- 3.1.2 向纯化反应液中加入16.5 μ L去离子水使纯化反应缓冲液体积为100 μ L。
- 3.1.3 将上述反应缓冲液转移至一新的1.5 mL离心管中。
- 3.1.4 加入60 μ L混合均匀的磁珠，涡旋震荡5秒钟后，室温静置5分钟。
- 3.1.5 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 分钟），小心地将上清溶液转移至新的1.5 mL离心管中，并弃去磁珠。

注：不要弃除上清。

- 3.1.6 向上清中加入20 μ L混合均匀的磁珠，涡旋震荡5秒钟后室温放置5分钟。

3.1.7 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注：不要弃除磁珠。

3.1.8 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μL 新配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。

3.1.9 重复步骤3.1.8。

3.1.10 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。将离心管从磁力架上取下，加入28 μL EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)或去离子水中，室温静置5分钟。短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将23 μL 澄清溶液转移至一个新的离心管中。

3.2 另一种方案：DNA片段的纯化

3.2.1 涡旋振荡磁珠20秒，使其彻底混匀为均一溶液。

3.2.2 将纯化反应液转移至一新的1.5 mL离心管中。

3.2.3 加入1倍样品体积的磁珠，涡旋振荡5秒钟后，室温静置5分钟。

3.2.4 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注：不要弃除磁珠。

3.2.5 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μL 新鲜配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。

3.2.6 重复步骤3.2.5。

3.2.7 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。

3.2.8 将离心管从磁力架上取下，加入28 μL EB（自备）或去离子水，涡旋振荡使磁珠完全重悬于28 μL EB（自备）或去离子水中，室温静置5分钟。短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将23 μL 澄清溶液转移至一个新的离心管中。

4. 向上述反应液中加入25 μL 富集缓冲液，2 μL oligo2混合液（客户自备），先98°C反应30 s，然后98°C 10 s、65°C 30 s、72°C 30 s此步骤重复6-16次，最后在72°C反应5 min。富集后核酸，可置于-80°C长期保存。