



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】

型号一：50次/盒，200次/盒

型号二：96次/盒

型号三：96次/盒

【预期用途】

用于核酸的提取、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人源粪便样本中提取总DNA，包括样本中的细胞、细菌、寄生虫以及病毒的总DNA的方法，也适用于含有高浓度PCR反应抑制剂的样本DNA的提取。本试剂盒采用独特的缓冲系统使裂解液中的DNA高效结合到吸附柱或磁珠上，PCR和酶反应的抑制剂以及残留的杂质可通过洗涤步骤有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度DNA。纯化得到的DNA可以直接用于二代测序(16s扩增子和宏基因组)、文库构建、PCR、qPCR、Southern Blot、酶切分子标记等下游实验。

【主要组成成分】

型号一：柱式法

试剂名称	50次/盒		200次/盒	
	规格	数量	规格	数量
裂解缓冲液	45 mL/瓶	1瓶	180 mL/瓶	1瓶
除杂缓冲液	11 mL/瓶	1瓶	42 mL/瓶	1瓶
结合缓冲液	10 mL/瓶	1瓶	40 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	13 mL/瓶	1瓶	52 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	26 mL/瓶	1瓶	70 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	13 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
核糖核酸酶A	240 μ L/支	1支	900 μ L/支	1支
研磨管	50个/包	1包	50个/包	4包
吸附柱	50个/包	1包	50个/包	4包

型号二：磁珠法

试剂名称	96次/盒	
	规格	数量
裂解缓冲液	85 mL/瓶	1瓶
除杂缓冲液	20 mL/瓶	1瓶
结合缓冲液	18 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	80 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	50 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	25 mL/瓶	1瓶
核糖核酸酶A	450 μ L/支	1支
磁珠悬浮液	1 mL/支	2支
研磨管	96个/包	1包

型号三：预装板

试剂名称	96次/盒	
	规格	数量
裂解缓冲液	85 mL/瓶	1瓶
除杂缓冲液	20 mL/瓶	1瓶
核糖核酸酶A	450 μ L/支	1支
研磨管	96个/包	1包
96孔预装板	16次/板	6板
8联深孔磁套	2条/包	6包

【储存条件及有效期】

除杂缓冲液2-8℃保存，其他组分4-30℃保存，有效期12个月。

除杂缓冲液低温冰袋运输，其他可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1. 适用样本类型：人源粪便样本。
2. 样本处理与保存：常温处理，非裂解型保存液保存或冷冻保存。
3. 样本运输：常温或冷冻运输。

【自备仪器、试剂】

无水乙醇（分析纯）、异丙醇（分析纯）

【检验方法】

样本前处理：

- I. 短暂离心研磨管以使珠子沉淀在底部。
- II. a) 向研磨管中加入 0.1 - 0.3g 粪便样本，加入740-820 μL 裂解缓冲液与4 μL 核糖核酸酶A，旋紧管盖，短暂涡旋以混合。
b) 若为非裂解型粪便保存液(如 CWY041S 和 CWY041M) 保存的粪便样本，向研磨管中加入 200 μL - 600 μL 固液混合物，13000 rpm离心1min，弃掉保存液(若离心后的固体量过少，可再次富集，但不宜超过0.3 g)。加入620 μL 裂解缓冲液和4 μL 核糖核酸酶A，旋紧管盖，短暂涡旋以混合。
- III. 将研磨管固定在装有 2 mL适配器的振荡研磨装置中，并根据您的设备使用优化的研磨条件进行处理(参见附录)。
- IV. 将研磨管在恒温混匀仪上以70℃，1200 rpm振荡10分钟。随后13000 rpm离心2分钟以沉淀固体颗粒。转移540 μL 上清液至新的2 mL离心管。
- V. 加入180 μL 除杂缓冲液，涡旋5秒，13000 rpm离心2分钟。
注意：除杂缓冲液待即将使用前取出，用完请立即放在 2-8 °C 储存。
- VI. 型号一、二、三分别按对应的操作步骤操作。

型号一：柱式法操作步骤

- 1.1 在新的离心管中依次加入160 μL 结合缓冲液、480 μL 步骤V的上清液、320 μL 异丙醇，涡旋5秒。
- 1.2 将上步中溶液转移 650 μL 到已装入收集管的吸附柱中，12,000 rpm (~13,400xg) 离心1分钟。
- 1.3 倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。重复步骤1.2直至溶液全部转移完。
- 1.4 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液1 (使用前检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 1.5 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液2 (使用前检查是否已加入无水乙醇)，12,000rpm 离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 1.6 重复步骤1.5。
- 1.7 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。
- 1.8 将吸附柱置于一个新的离心管(自备)中，向吸附柱的中间部位悬空滴加50-200 μL 洗脱缓冲液或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液， -20°C 保存DNA。
注意：1) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。
2) 用另外的50 - 100 μL 洗脱缓冲液或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
3) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤1.8所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤1.8，但可能会减少总产量。
4) 洗脱缓冲液不含螯合剂，请置于 -20°C 保存DNA。
5) 基因组DNA模板中残余的微量PCR抑制剂可能对PCR反应产生不良影响，可将DNA稀释2 - 10倍通常即可解决。

型号二：磁珠法操作步骤

1. 手动步骤

- 1.1 在新的离心管中依次加入160 μL 结合缓冲液、480 μL 步骤V的上清液、320 μL 异丙醇、20 μL 磁珠悬浮液，涡旋振荡混匀5秒后将离心管放于 25°C 、1600 rpm的恒温混匀仪上振荡混匀10分钟。
注意：磁珠悬浮液加入前需涡旋振荡20秒使其充分混匀。磁珠悬浮液可与异丙醇按照上述体积根据样本数量预混然后加入。
- 1.2 将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侧壁后彻底弃去溶液(保持离心管固定于磁力架上)。

- 1.3 将离心管从磁力架上取下，加入750 μL漂洗缓冲液1 (使用前请检查是否已加入无水乙醇) 后涡旋点震1分钟或涡旋振荡5秒后放于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上 振荡混匀2分钟 (振荡过程中确保磁珠处于混匀状态) 。之后将离心管放于磁力架 上静置1分钟，待磁珠完全吸附于离心管侧壁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)。
- 1.4 重复步骤1.3。
- 1.5 将离心管从磁力架上取下，加入750 μL漂洗缓冲液2 (使用前请检查是否已加入无水乙醇) 后涡旋点震1分钟或涡旋振荡5秒钟后放于25℃、1600rpm的恒温混匀仪上振荡混匀2分钟 (振荡过程中确保磁珠处于混匀状态)。之后将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侧壁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)。
- 1.6 重复步骤1.5。
- 1.7 保持离心管固定于磁力架上，用移液器进一步去除离心管管底和管盖上的溶液，之后室温放置5- 10分钟，使乙醇挥发干净(肉眼观察磁珠表面变成哑光且磁珠无干裂)。
- 1.8 将离心管从磁力架上取下，加入50 -200 μL洗脱缓冲液。涡旋振荡使磁珠完全悬浮于洗脱液中后将其放于 56℃、1600 rpm的恒温混匀仪上振荡洗脱10分钟，或将离心管放于56℃水浴锅中孵育10分钟，期间每隔3分钟涡旋振荡10秒。
- 1.9 将离心管放于磁力架上静置2分钟，待磁珠完全吸附于离心管侧壁后用移液器将洗脱液转移至新的离心管中 -20℃保存备用。

2. 与CWE2100或CWE3200匹配

2.1 按下表向96DW深孔板中加入相应试剂。

位置	试剂
1&7列	结合缓冲液: 160 μL 裂解物: 480 μL 异丙醇: 320 μL
2&8列	漂洗缓冲液1 : 750 μL
3&9列	漂洗缓冲液1 : 750 μL
4&10列	漂洗缓冲液2: 750 μL 磁珠悬浮液: 20 μL
5&11列	漂洗缓冲液2: 750 μL
6&12列	洗脱缓冲液: 100 μL

注意: 1&7列中试剂按照顺序依次加入。

漂洗缓冲液1、2使用前请检查是否已加入无水乙醇。

漂洗缓冲液2与磁珠悬浮液可按照上述体积根据样本数量预混，使用前涡旋10秒混匀。

2.2 将加入试剂的深孔板和磁套放于CWE2100或CWE3200的相应位置，运行CWY121-32提取程序。约40分钟后程序运行结束。

2.3 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20℃保存。

3. 与CWE9600或CWE960匹配

3.1 按下表向96DW深孔板中加入相应试剂。

位置	试剂
板 1	结合缓冲液: 160 μL 裂解物: 480 μL 异丙醇: 320 μL
板 2	漂洗缓冲液1 : 750 μL
板 3	漂洗缓冲液1 : 750 μL
板 4	漂洗缓冲液2: 750 μL 磁珠悬浮液: 20 μL
板 5	漂洗缓冲液2: 750 μL
板 6	洗脱缓冲液: 100 μL

注意: 板1中试剂按照顺序依次加入。

漂洗缓冲液1、2使用前请检查是否已加入无水乙醇。

漂洗缓冲液2与磁珠悬浮液可按照上述体积根据样本数量预混，使用前涡旋10秒混匀。

3.2 将加入试剂的深孔板和磁套放于CWE960（磁套置于盘位4）或CWE9600（磁套置于盘位8）的相应位置，运行CWY121-96提取程序，约50分钟后程序运行结束。

3.3 将深孔板6中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中 -20℃保存。

型号三：预装板操作步骤

1. 将96孔预装板从试剂盒中取出放入水平离心机300xg离心10秒钟。
2. 将深孔板从离心机中取出，小心去除热封膜，期间防止深孔板震动。
3. 向深孔板的1、7列加入480 μL步骤V的上清液、320 μL异丙醇。
4. 将加入样本的深孔板放入CWE2100或CWE3200中，之后磁棒套固定在磁棒套架上。
5. 运行CWY121-32程序，约40分钟后程序运行结束。
6. 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中 -20℃保存。

附录

使用以下方法之一研磨样本

1. 涡旋振荡仪上以最大速度手动涡旋振荡10分钟。
2. 在搭配有1.5-2 mL水平离心管支架的涡旋振荡仪上以最大速度振荡10分钟(让研磨管保持水平放置)。若样本数量超过12, 延长5-10分钟。
例如使用 Scientific Industries 或 Mobio 的 Vortex-Genie2 涡旋振荡仪。
3. 使用凯杰的 TissueLyser II 时, 以25 Hz研磨10分钟。
4. 使用凯杰的 PowerLyzer 24 Homogenizer 时, 以2000 rpm 的速度均质化30秒, 暂停30秒, 然后以2000 rpm的速度再次均质化30秒。
5. 使用 MP Biomedicals 的 Fastprep-24 时, 推荐速度为6.0, 时间为40秒。

【注意事项】

1. 样品应避免反复冻融, 否则会导致提取的DNA 片段较小且提取量下降。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明预先在漂洗缓冲液1(浓缩液)和漂洗缓冲液2(浓缩液)中加入无水乙醇。
3. 除杂缓冲液待即将使用前取出, 用完立即放在2-8°C储存。
4. 磁珠悬浮液严禁冰冻、离心。冰冻、离心可能会对磁珠造成不可逆的损害。