



# 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】

型号一：96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】

本产品使用裂解缓冲液、无水乙醇实现DNA和蛋白质的分离和浓缩，使DNA游离释放；磁珠可以特异性地吸附DNA，通过洗涤，去除DNA以外的蛋白质等杂质；洗脱缓冲液解离吸附在磁珠上的DNA，得到纯度和浓度均很高的DNA。

## 【主要组成成分】

型号一：

试剂名称	96次/盒	
	规格	数量
裂解缓冲液1	36 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	36 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
漂洗缓冲液3（可选）	96 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	30 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	25 mg/支	2支
蛋白酶K保存液	1.25 mL/支	2支
RNA酶A（可选）	0.3 mL/支	1支
磁珠悬浮液	1 mL/支	1支

型号二:	名称	规格	列	试剂名称
	96孔预装板	16次/板×6板	1、7	裂解缓冲液 2
			2、8	漂洗缓冲液 1
			3、9	漂洗缓冲液 2
			4、10	漂洗缓冲液 3, 磁珠悬浮液
			5、11	漂洗缓冲液 4
			6、12	洗脱缓冲液
	8联深孔磁套	2条/包×6包		
	蛋白酶K	1.25 mL/支×4支		
	裂解缓冲液 1	54 mL/瓶×1瓶		
	脱蜡剂	50 mL/瓶×1瓶		
	RNA酶A	0.3ml/支×1支		

型号三:	试剂名称	96次/盒	
		规格	数量
	样本板	1块	1
	漂洗板1	1块	1
	漂洗板2	1块	1
	漂洗板3	1块	1
	漂洗板4	1块	1
	洗脱板	1块	1
	磁套板	1块	1
	蛋白酶K	1.25 mL/支	4支
	脱蜡剂	50 mL/瓶	1瓶
	裂解缓冲液 1	54 mL/瓶	1瓶
	RNA 酶A	0.3 mL/支	1支

### 【保存条件及有效期】

4-30℃保存，有效期12个月。

可在4-37℃运输，运输时间建议不超过7天。

### 【样本要求】

型号一:

适用样本类型及样本处理、保存和运输:

1. 新鲜血液或抗凝血制成的血片。

(1) 样本处理与保存: 抗凝血制成的血片按常规方法制备，新鲜样本应尽快处理或分装后于-70℃冻存，避免反复冻融。

(2) 样本运输: 应采用泡沫箱加冰或干冰密封运输。

## 2. 唾液

唾液与保护液等体积混匀后室温保存、运输。

## 3. 口腔拭子

口腔拭子样本需常温保存、运输。

## 4. 新鲜或冷冻的组织。

(1) 样本处理与保存：新鲜样本应尽快处理或分装后于-70℃冻存，避免反复冻融。

(2) 样本运输：应采用冰壶或者泡沫箱加冰或干冰密封运输。

### 型号二、型号三：

适用样本类型及样本处理、保存和运输：

#### 1. 新鲜血液或抗凝血

(1) 样本处理与保存：样本使用抗凝管保存，采集好的样本可在4℃短期保存，长期保存应该分装保存在-70℃，避免反复冻融。

(2) 样本运输：4度低温运输。

#### 2. 新鲜血液或抗凝血制成的血片。

(1) 样本处理与保存：血片按常规方法制备，干燥后常温或4℃保存。

(2) 样本运输：应采用泡沫箱加冰或干冰密封运输。

#### 3. 唾液

唾液与保护液等体积混匀后室温保存、运输。

#### 4. 口腔拭子

口腔拭子样本需常温保存、运输。

#### 5. 新鲜或冷冻的组织

(1) 样本处理与保存：新鲜样本应尽快处理或分装后于-70℃冻存，避免反复冻融。

(2) 样本运输：应采用泡沫箱加冰或干冰密封运输。

#### 6. FFPE样本

(1) 样本处理与保存：常温处理保存。

(2) 样本运输：常温运输。

#### 7. 漱口水、羊水

(1) 样本处理与保存：漱口水样本4℃保存或离心得到沉淀-20℃或-70℃冻存。羊水样本应尽快处理或分装后于-20℃或-70℃冻存，避免反复冻融。

(2) 样本运输：应采用泡沫箱加冰或干冰密封运输。

## 【检验方法】

### 型号一：

#### 一、新鲜血液或抗凝血制成的血片

实验前准备：向每支蛋白酶K中加入1.25 mL的蛋白酶K保存液使其溶解，-20℃保存。

#### 1. 向1.5 mL离心管中加入20 μL蛋白酶K溶液，然后再加入180 μL裂解缓冲液1。

注意：如果样品数量较多，可将蛋白酶K和裂解缓冲液按比例混合，向离心管中加入200 μL混合物。

2. 向上一步的离心管中加入3张直径为3 mm的血片后，将离心管放入56℃、1300 rpm的恒温混匀仪上振荡裂解30分钟。  
**注意：**如无恒温混匀仪，离心管涡旋振荡10秒钟后将其放入56℃水浴锅或金属浴中孵育30分钟。期间，每隔5分钟涡旋振荡5秒钟。
3. 向上一步的离心管中加入200 μL裂解缓冲液2后，将离心管放入56℃、1300 rpm的恒温混匀仪上振荡裂解10分钟。  
**注意：**如无恒温混匀仪，离心管涡旋振荡10秒钟后将其放入56℃水浴锅或金属浴中孵育10分钟。期间，每隔5分钟涡旋振荡5秒钟。
4. 样品裂解期间，向新的离心管中加入10 μL磁珠悬浮液和200 μL异丙醇。涡旋振荡10秒钟，使磁珠悬浮液和异丙醇混合为均一的溶液。  
**注意：**如果样品数量较多，可将磁珠悬浮液和异丙醇按比例混合并涡旋振荡20秒使其成为均一溶液，向新的离心管中加入210 μL混合物。
5. 将步骤3中离心管室温放置5分钟后短暂离心，将裂解产物彻底转移至步骤4的离心管中。涡旋震荡5秒钟后，将步骤4中离心管放入25℃、1300 rpm的恒温混匀仪中振荡5分钟。  
**注意：**如无恒温混匀仪，可将离心管涡旋振荡10秒钟后连续颠倒混匀5分钟。
6. 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。
7. 向离心管中加入500 μL漂洗缓冲液1（加入前检测是否已加入无水乙醇）后，将离心管从磁力架上取下，涡旋振荡5秒钟后将其放入25℃、1300 rpm的恒温混匀仪上振荡2分钟。  
**注意：**如无恒温混匀仪，可将离心管涡旋振荡10秒钟使磁珠完全悬浮于漂洗液中。
8. 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。  
**注意：**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。
9. 向离心管中加入500 μL漂洗缓冲液2（加入前检测是否已加入无水乙醇）后，将离心管从磁力架上取下，涡旋震荡5秒钟后放入25℃、1300 rpm的恒温混匀仪上振荡2分钟。  
**注意：**如无恒温混匀仪，可将离心管涡旋振荡10秒钟使磁珠完全悬浮于漂洗液中。
10. 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。  
**注意：**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。
11. 重复步骤9-10。
12. 保持离心管固定于磁力架上，用10 μL移液器进一步去除离心管底和管盖上的溶液后室温放置5分钟。
13. 向离心管中加入30-100 μL洗脱缓冲液或去离子水。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入56℃、1300 rpm的恒温混匀仪上振荡洗脱10分钟。  
**注意：**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) 如未能将磁珠从离心管侧壁上涡旋振荡至洗脱液中会降低提取得率。  
3) 如无恒温混匀仪，可将离心管放于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。
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℃保存备用。此时可以弃去磁珠。

## 二、口腔拭子

### 自备仪器及试剂

1. 恒温混匀仪——推荐品牌康为世纪，货号：CW2593
2. 2/15 mL磁力架——推荐品牌康为世纪，货号：CW2594
3. 异丙醇、无水乙醇

### 实验前准备：

向每支蛋白酶K中加入1.25ml的蛋白酶K保存液使其溶解，-20℃保存。

#### 1. 样本裂解

##### 1.1 干燥保存的口腔拭子

1.1.1 将口腔拭子的棉签用剪刀从杆上剪下，置于2.0 mL的离心管中。

1.1.2 向离心管中加入20 μL蛋白酶K和300 μL裂解缓冲液1，之后将离心管放于56℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解30分钟。

**注意：如无恒温混匀仪，将离心管涡旋震荡10秒钟后放于56℃水浴锅中孵育30分钟，期间每隔5分钟涡旋震荡10秒钟。**

1.1.3 将离心管从恒温混匀仪上取下，短暂离心后加入300 μL裂解缓冲液2。之后将离心管放于56℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解10分钟。

**注意：如无恒温混匀仪，将离心管涡旋震荡10秒钟后放于56℃水浴锅中孵育10分钟，期间每隔5分钟涡旋震荡10秒钟。**

##### 1.2 保护液中保存的口腔拭子

1.2.1 将口腔拭子的棉签从杆上剪下，置于2.0 mL的离心管中。

1.2.2 向离心管中加入20 μL蛋白酶K、300 μL保存该拭子的保护液和200 μL裂解缓冲液2，之后将离心管放于56℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解30分钟。

**注意：如无恒温混匀仪，将离心管涡旋震荡10秒钟后放于56℃水浴锅中孵育30分钟，期间每隔5分钟涡旋震荡10秒钟。**

2. 两种拭子样本，均将离心管从恒温混匀仪上取下，室温放置5分钟。短暂离心后，将裂解产物转移至1.5 mL的离心管中。
3. 向离心管中加入300 μL异丙醇和10 μL充分混匀的磁珠悬浮液，涡旋震荡5秒钟后将离心管放于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀5分钟或将离心管连续颠倒混匀10分钟。
4. 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充分弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
5. 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分钟或涡旋震荡5秒钟后放于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震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）。
6. 重复步骤5
7. 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分钟或涡旋震荡5秒钟后放于25℃、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震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）。

8. 重复步骤7
9. 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。  
**注意：如果离心管侧壁上有液珠，可向离心管中加入750  $\mu\text{L}$ 无水乙醇。盖盖后颠倒离心管（保持离心管固定于磁力架上），之后彻底弃去无水乙醇。**
10. 将离心管从磁力架上取下，加入30-100  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液。涡旋震荡使磁珠完全悬浮于洗脱缓冲液中后将其放于56 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟，或将离心管放于56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育10分钟，期间每隔3分钟涡旋震荡10秒钟。

### 三、唾液

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缓冲液转移至新的离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### 自备仪器、试剂

1. 恒温混匀仪——推荐品牌康为世纪，货号：CW2593
2. 2/15 mL磁力架——推荐品牌康为世纪，货号：CW2594
3. 异丙醇、无水乙醇

#### 实验前准备

向每支蛋白酶K中加入1.25 mL的蛋白酶K保存液使其溶解，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1. 转移400  $\mu\text{L}$ 唾液与保护剂的混合溶液至1.5 mL离心管中，然后16,000 $\times g$ 离心1分钟。
2. 将离心管从离心机中取出，转移300  $\mu\text{L}$ 上清液至新的1.5 mL离心管中，之后向新的离心管加入20  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K和200  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液2。涡旋震荡混匀后，将新离心管放入56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育1小时。此时可弃去旧离心管。
3. 将离心管从水浴锅中取出，室温放置5分钟后短暂离心使溶液回流于离心管底部。向离心管中加入310  $\mu\text{L}$ 充分混匀的异丙醇（300  $\mu\text{L}$ ）与磁珠悬浮液（10  $\mu\text{L}$ ）混合物，涡旋震荡5秒钟后立即放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀5分钟。
4. 将离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠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）。
5. 将离心管从磁力架上取下，加入750  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液1（加入前请检查是否已加入无水乙醇）后涡旋点震1分钟或涡旋点震5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震荡过程确保磁珠处于悬浮混匀状态）。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠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充分弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
6. 重复步骤5。
7. 将离心管从磁力架上取下，加入750  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液2（加入前请检查是否已加入无水乙醇）后涡旋点震1分钟或涡旋点震5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡混匀2分钟（震荡过程确保磁珠处于悬浮混匀状态）。之后将离心管放于磁力架上静置1分钟，待磁珠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充分弃去溶液（保持离心管固定于磁力架上）。
8. 重复步骤7。

#### 9. 选择步骤:

- 9.1 保持离心管固定于磁力架上, 用移液器取出离心管管底和管盖上的溶液, 之后室温放置5-10分钟使乙醇充分挥发干净。如离心管侧壁上有液珠, 可向离心管中加入750  $\mu\text{L}$ 无水乙醇。盖盖后颠倒离心管, 之后重复弃去溶液。
- 9.2 保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入750  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液3, 待悬起的磁珠重新吸附于磁力架上后立即充分弃去溶液。
10. 将离心管从磁力架上取下, 加入50-200  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液。涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱缓冲液中后将其放于56°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟, 或将离心管在56°C水浴锅中孵育10分钟, 期间每隔3分钟涡旋震荡10秒钟。
11. 将离心管放于磁力架上静置2分钟, 待磁珠充分吸附于离心管侧壁后用移液器将溶液转移至新的离心管中, -20°C保存备用。

### 四、新鲜或冷冻的组织

#### 自备仪器、试剂

1. 恒温混匀仪——推荐品牌康为世纪, 货号: CW2593
2. 2/15 mL磁力架——推荐品牌康为世纪, 货号: CW2594
3. 异丙醇、无水乙醇

#### 实验前准备

向每支蛋白酶K中加入1.25 mL的蛋白酶K保存液使其溶解, -20°C保存。

1. 称取20-30 mg组织, 将组织在液氮中磨碎或使用组织匀浆机打碎, 将打碎的组织转移到1.5 mL离心管中。
2. 向上述离心管中加入180  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液1和20  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K溶液后将离心管固定于56°C、1200 rpm恒温混匀仪上震荡裂解1小时或56°C水浴过夜至固体组织充分裂解, 即为裂解产物。
3. 可选步骤: 如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响, 建议向裂解产物中加入2  $\mu\text{L}$ 浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液, 震荡混匀, 室温放置2 min。
4. 向裂解产物中加入200  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液2, 涡旋振荡混匀。
5. 向离心管中加入200  $\mu\text{L}$ 异丙醇与10  $\mu\text{L}$ 磁珠悬浮液后涡旋震荡混匀5秒钟, 之后将离心管固定于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合10分钟。
6. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟, 之后弃去溶液。
7. 向离心管中加入750  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液1(使用前请检查是否已加入无水乙醇), 涡旋震荡5秒钟后置于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。
8. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟, 之后弃去溶液。
9. 重复步骤7-8。
10. 向离心管中加入750  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液2(使用前请检查是否已加入无水乙醇), 涡旋震荡5秒钟后置于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。
11. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟, 之后弃去溶液。
12. 重复步骤10-11。
13. 离心管短暂离心后, 将其重新固定于磁力架上, 用移液器去除管底溶液, 之后开盖室温放置5-10分钟使乙醇充分挥发。

14. 向离心管中加入50-200  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液后涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱液中，之后将离心管固定于56 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟。
15. 将离心管固定于磁力架上静置2分钟，之后将洗脱液转移至新的离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 型号二：

### 自备仪器、试剂

1. 恒温混匀仪——推荐品牌康为世纪，货号：CW2593
2. 康为世纪CWE2100或CWE3200全自动核酸提取仪
3. 异丙醇

### 一、新鲜血液或抗凝血

1. 向96深孔板的1&7列中加入40  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K溶液和250  $\mu\text{L}$ 的血液。  
注意：冷冻抗凝血液需提前在室温（15-30 $^{\circ}\text{C}$ ）下放置，融化混匀。
2. 将加入样本的深孔板和磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood提取程序，约15 min后，向96深孔板的1&7列中加入300  $\mu\text{L}$ 异丙醇，继续运行提取程序，约30min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 二、新鲜血液或抗凝血制成的血片

1. 取1.5 mL离心管，加入1-2片直径为6 mm的血斑或3-10片直径为3 mm的血斑。
2. 向离心管中加入40  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K溶液和300  $\mu\text{L}$ 的裂解缓冲液1，涡旋振荡5秒钟后，将离心管放于75 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解45分钟，形成裂解混合液。
3. 将上述裂解混合液加入96深孔板的1&7列后，加入300  $\mu\text{L}$ 异丙醇。
4. 将加入裂解混合液和异丙醇的深孔板以及磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood Spots提取程序，约40min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
5. 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 三、唾液

1. 向96深孔板的1&7列中加入40  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K溶液和300  $\mu\text{L}$ 的唾液。
2. 将加入样本的深孔板和磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood提取程序，约15 min后，向96深孔板的1&7列中加入300  $\mu\text{L}$ 异丙醇，继续运行提取程序，约30 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 四、口腔拭子

#### a.干拭子：

1. 将口腔拭子的棉签用剪刀从杆上剪下，置于2.0 mL的离心管中。
2. 向离心管中加入40  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K和500  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液1，涡旋振荡5秒钟后，将离心管放于75 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解15分钟，形成裂解混合液。



3. 将上述裂解混合液加入96深孔板的1&7列后，加入300 $\mu$ L异丙醇。
4. 将加入裂解混合液和异丙醇的深孔板以及磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood Spots提取程序，约40 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
5. 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20 $^{\circ}$ C保存。

b.含保护液的口腔拭子：

1. 向96深孔板的1&7列中加入40  $\mu$ L蛋白酶K、300  $\mu$ L保存该拭子的保护液。
2. 将加入样本的深孔板和磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood提取程序，约15 min后，向96深孔板的1&7列中加入300  $\mu$ L异丙醇，继续运行提取程序，约30 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
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 $^{\circ}$ C保存。

## 五、新鲜或冷冻的组织

1. 称取20-30 mg 动物组织，将组织在液氮中磨碎或使用组织匀浆机打碎，将磨碎的组织转移到1.5 mL离心管中，然后加入40  $\mu$ L蛋白酶 K和300  $\mu$ L裂解缓冲液1，涡旋振荡5秒钟后，于56 $^{\circ}$ C、1200 rpm恒温混匀仪上震荡裂解1小时，或56 $^{\circ}$ C水浴过夜至固体组织消化完全。然后12000 rpm 离心2分钟，将上清液转移至新的1.5 mL离心管中。
2. 可选步骤：如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响，建议向裂解产物中加入2  $\mu$ L浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2 min。

**注意：若出现RNA清除不彻底的情况，可加入4  $\mu$ L的RNA酶A，并延长室温放置时间。**

3. 将上述裂解混合液加入96深孔板的1&7列后，加入300  $\mu$ L异丙醇。
4. 将加入裂解混合液和异丙醇的深孔板以及磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood Spots提取程序，约40 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
5. 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20 $^{\circ}$ C保存。

## 六、FFPE样本

1. 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10  $\mu$ m的薄片。
2. 取约1 cm<sup>2</sup>的切片（共约3-8片）置于1.5 mL离心管中，加入300  $\mu$ L 脱蜡剂，涡旋震荡10秒，再加入300  $\mu$ L裂解缓冲液1和40  $\mu$ L蛋白酶K，涡旋震荡10秒。
3. 12000 rpm，25 $^{\circ}$ C 离心1分钟。
4. 56 $^{\circ}$ C孵育1小时，直至样品完全溶解。90 $^{\circ}$ C孵育1小时。
5. 12,000 rpm，25 $^{\circ}$ C离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约300  $\mu$ L）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。
6. 可选步骤：如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响，建议向裂解产物中加入2  $\mu$ L浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2 min。
7. 将上述下层水相加入96深孔板的1&7列后，加入300  $\mu$ L异丙醇。
8. 将加入下层水相和异丙醇的深孔板以及磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood Spots提取程序，约40 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
9. 将深孔板6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20 $^{\circ}$ C保存。

## 七、漱口水\羊水

1. 取50 mL离心管，加入1-20 mL漱口水或羊水，800 rpm离心5分钟后，弃上清，保留沉淀。
2. 加入300  $\mu$ L裂解缓冲液1重悬沉淀，将所有液体吸入1.5 mL离心管中。
3. 加入40  $\mu$ L蛋白酶K，涡旋振荡5秒钟后，75 $^{\circ}$ C、1200 rpm恒温混匀仪上震荡裂解15分钟。
4. 将上述裂解混合液加入96深孔板的1&7列后，加入300  $\mu$ L异丙醇。
5. 将加入裂解混合液和异丙醇的深孔板以及磁套放于CWE2100的相应位置，运行CWY092-32-Blood Spots提取程序，约40 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
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 $^{\circ}$ C保存。

血液、唾液、含保护液的口腔拭子：

提取程序（CWY092-32-Blood）：

磁棒位置	温度（ $^{\circ}$ C）	释放磁珠	搅拌速度	搅拌时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
1	80	是	中速	2 min	3	0	0 秒
			快速	3 min			
1	暂停，加300 $\mu$ L 异丙醇						
4	收集磁珠，2 次，2 秒/次						
1	0	是	中速	2 min	1	3	5 秒
			快速	3 min			
2	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
3	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
4	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
5	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
5	晾干磁珠，深孔板外 5 min						
6	56 $^{\circ}$ C	是	快速	2 min	2	2	5 s
			中速	3 min			
4	释放磁珠						

血片、干拭子、新鲜或冷冻的组织、FFPE样本、漱口水\羊水：

提取程序（CWY092-32-Blood Spots）：

磁棒位置	温度（ $^{\circ}$ C）	释放磁珠	搅拌速度	搅拌时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
4	收集磁珠，2 次，2 秒/次						
1	0	是	中速	2 min	3	3	5 秒
			快速	3 min			
2	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
3	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
4	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
5	0	是	快速	2 min	1	2	2 秒
5	晾干磁珠，深孔板外 5 min						
6	56 $^{\circ}$ C	是	快速	2 min	2	2	5 s
			中速	3 min			
4	释放磁珠						

型号三：

自备仪器及试剂

1. 恒温混匀仪——推荐品牌康为世纪，货号：CW2593
2. 康为世纪CWE960全自动核酸提取仪
3. 异丙醇

一、新鲜血液或抗凝血

1. 向样本板中加入40 μL蛋白酶K溶液和250 μL的血液。  
注意：冷冻抗凝血需提前在室温（15-30℃）下放置，融化混匀。
2. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

3. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood程序，约15 min后，向样本板中加入300 μL异丙醇，继续运行提取程序，约30 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
4. 将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20℃保存备用。

二、新鲜血液或抗凝血制成的血片

1. 取1.5 mL离心管，加入1-2片直径为6 mm的血斑或3-10片直径为3 mm的血斑。
2. 向离心管中加入40 μL蛋白酶K溶液和300 μL的裂解缓冲液1，涡旋振荡5秒钟后，将离心管放于75℃、1200 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解45分钟，形成裂解混合液。
3. 在预装好试剂的样本板孔中加入2中裂解产物后，加入300 μL异丙醇。
4. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

5. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood Spots程序。
6. 约40分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

### 三、唾液

1. 向样本板中加入40 $\mu$ L蛋白酶K溶液和300  $\mu$ L的唾液。
2. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

3. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood程序，约15 min后，向样本板中加入300  $\mu$ L异丙醇，继续运行提取程序，约30 min后程序运行结束，取出深孔板和磁套。
4. 将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

### 四、口腔拭子

#### a.干拭子:

1. 将口腔拭子的棉签用剪刀从杆上剪下，置于2.0 mL的离心管中。
2. 向离心管中加入40  $\mu$ L蛋白酶K和500  $\mu$ L裂解缓冲液1，涡旋振荡5秒钟后，将离心管放于75°C、1200 rpm的恒温混匀仪上震荡裂解15分钟，形成裂解混合液。
3. 在预装好试剂的样本板孔中加入2中裂解产物后，加入300  $\mu$ L异丙醇。
4. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

5. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood Spots程序。
6. 约40分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

b.含保护液的口腔拭子:

1. 向样本板中加入40  $\mu$ L蛋白酶K和300  $\mu$ L保存该拭子的保护液。
2. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

3. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中, 运行CWY092-96-Blood程序, 约15min后, 向样本板中加入300  $\mu$ L异丙醇, 继续运行提取程序, 约30 min后程序运行结束, 取出深孔板和磁套。
4. 将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

### 五、新鲜或冷冻的组织

1. 称取20-30 mg 动物组织, 将组织在液氮中磨碎或使用组织匀浆机打碎, 将磨碎的组织转移到1.5 mL离心管中, 然后加入40  $\mu$ L蛋白酶K和300  $\mu$ L裂解缓冲液1, 涡旋振荡5秒钟后, 于56°C、1200 rpm恒温混匀仪上震荡裂解1小时, 或56°C水浴过夜至固体组织消化完全。12000 rpm 离心2分钟, 将上清液转移至新的1.5 mL离心管中。
2. 可选步骤: 如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响, 建议向裂解产物中加入2  $\mu$ L浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液, 震荡混匀, 室温放置2 min。

**注意: 若出现RNA清除不彻底的情况, 可加入4  $\mu$ L的RNA酶A, 并延长室温放置时间。**

3. 在预装好试剂的样本板孔中加入2中裂解产物后, 加入300 $\mu$ L异丙醇。
4. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

5. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中, 运行CWY092-96-Blood Spots程序。
6. 约40分钟后程序运行结束, 将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出, 将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

## 六、FFPE样本

1. 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm的薄片。
2. 取约1 cm<sup>2</sup>的切片（共约3-8片）置于1.5mL离心管中，加入300 μL 脱蜡剂，涡旋震荡10秒，再加入300 μL裂解缓冲液1和40 μL蛋白酶K，涡旋震荡10秒。
3. 12000 rpm，25°C 离心1分钟。
4. 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。
5. 12,000 rpm，25°C离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约300 μL）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。
6. 可选步骤：如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响，建议向裂解产物中加入2μL 浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2 min。
7. 在预装好试剂的样本板孔中加入6中裂解产物（下层水相）后，加入300μL异丙醇。
8. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

9. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood Spots程序。
10. 约40分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

## 七、漱口水\羊水

1. 取50 mL离心管，加入1-20 mL漱口水或羊水，800 rpm离心5分钟后，弃上清，保留沉淀。
2. 加入300 μL裂解缓冲液1重悬沉淀，将所有液体吸入1.5 mL离心管中。
3. 加入40 μL蛋白酶K，涡旋振荡5秒钟后，75°C、1200 rpm恒温混匀仪上震荡裂解15分钟。
4. 在预装好试剂的样本板孔中加入3中裂解产物后，加入300 μL异丙醇。
5. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

## 【注意事项】

1. 在实验前，应仔细阅读本说明书。
2. 型号一中配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
3. 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。磁珠悬浮液使用前需涡旋震荡20秒使其充分混匀。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在漂洗缓冲液1（浓缩液）和漂洗缓冲液2（浓缩液）中加入无水乙醇并做好标记。
5. 使用前请检查裂解缓冲液1和裂解缓冲液2中是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将裂解缓冲液1和裂解缓冲液2于56℃水浴重新溶解。
6. 实验过程中，磁珠在溶液中的充分混匀对于提取的得率与纯度都有很大的影响。实验过程中务必使磁珠与溶液充分混匀。不同厂家生产的恒温混匀仪震荡混匀效果有一定差异，实验过程中请注意观察磁珠状态。如出现磁珠贴壁等未充分混匀的现象，请用移液器吹吸混匀或调整震荡频率。
7. 以上提取方案均可与自动化核酸提取仪器适配，具体方案由康为世纪另行提供。

- 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY092-96-Blood Spots程序。
- 约40分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，将洗脱板中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20℃保存备用。

血液、唾液、含保护液的口腔拭子：

提取程序（CWY092-96-Blood）：

工位	试剂	温度（℃）	释放磁珠	搅拌速度	搅拌时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
4	900 μL	装磁棒套						
1	900 μL	80	是	快速	2 min	3	0	0 s
				中速	3 min			
1	900 μL	暂停，加300 μL 异丙醇						
4	900 μL	收集磁珠，工位4，启用，2次，10 s						
1	900 μL	0	是	快速	2 min	1	2	10 s
				中速	3 min			
2	900 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
3	500 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
4	900 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
5	300 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
5	300 μL	干燥，工位5，启用，5 min						
6	70 μL	65	是	快速	2 min	2	2	5 s
				中速	3 min			
4	900 μL	释放磁珠						
4	900 μL	卸磁棒套						

血片、干拭子、新鲜或冷冻的组织、FFPE样本、漱口水/羊水：

提取程序（CWY092-96-Blood Spots）：

工位	试剂	温度（℃）	释放磁珠	搅拌速度	搅拌时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
4	900 μL	装磁棒套						
4	900 μL	收集磁珠，工位4，启用，2次，10 s						
1	900 μL	0	是	快速	2 min	3	2	10 s
				中速	3 min			
2	900 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
3	500 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
4	900 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
5	300 μL	0	是	快速	2 min	1	1	10 s
5	300 μL	干燥，工位5，启用，5 min						
6	70 μL	65	是	快速	2 min	2	2	5 s
				中速	3 min			
4	900 μL	释放磁珠						
4	900 μL	卸磁棒套						