



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】

500次/盒； 2000次/盒

【预期用途】

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】

本品可以灵活处理0.1-20 mL的全血，采用非离心柱的方法，无需使用苯酚、氯仿等有机溶剂，有效去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质污染。整个过程在一个管中操作，减少了污染及样本混淆的风险。提取的DNA产量高、质量好，可直接用于PCR、荧光定量PCR、酶切和Southern Blot以及文库构建等实验。

【主要组成成分】

试剂名称	50次/盒		400次/盒	
	规格	数量	规格	数量
红细胞裂解液	65 mL/瓶	2瓶	260 mL/瓶	2瓶
裂解缓冲液	30 mL/瓶	1瓶	120 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	30 mL/瓶	1瓶	60 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	3 mg/支	1支	12.5 mg/支	1支
蛋白酶K保存液	1.25 mL/支	1支	1.25 mL/支	1支

需要实验者自行准备的试剂：异丙醇、70%乙醇。

【储存条件及有效期】

红细胞裂解液2-8℃保存，其余组分0-35℃保存，有效期12个月。

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：适用于处理各种血液和细胞样本。
2. 样本处理与保存：新鲜血液需加入抗凝剂，血液样品避免反复冻融。如果提取冷冻血液的基因组DNA，建议37℃水浴，迅速解冻后再进行后续操作。
 - 1) 短期保存：已加入抗凝剂的血液样品可在2-8℃储存最多10天。对于某些实验例如Southern杂交等，需要得到完整全长的基因组DNA，血液样品在2-8℃储存不得超过3天，此时基因组DNA的降解程度较轻。
 - 2) 长期保存：已加入抗凝剂的血液请置于-70℃保存（如果提取的是高分子量的DNA，推荐使用EDTA作为抗凝剂）。
3. 样本运输：应采用冰壶或者泡沫箱加冰或干冰密封运输。

【检验方法】

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10 mg/ml，-20℃保存。

	500次/盒	2000次/盒
蛋白酶K保存液	加入0.3 mL	加入1.25 mL

1. 从100-900 μL 全血中提取基因组（以300 μL 血液处理量为例）

1.1 取300 μL 全血于2 mL离心管（自备）中，加入300 μL （样本等体积）红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，10,000 $\times\text{g}$ 离心20秒，弃上清。

1.2 再向离心管中加入450 μL （1.5倍样本体积）红细胞裂解液，涡旋震荡，使沉淀完全分散。10,000 $\times\text{g}$ 离心20秒，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上放置2分钟。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。将离心管倒置在吸水纸上，可以减少管壁上清的回流。

1.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶K的混合液（比例100:1）。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后1小时之内用完。

1.4 加入150 μL 裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：1) 如果有多个样品同时操作，加入裂解缓冲液/蛋白酶K混合液后立即涡旋震荡，不要等所有样品都加完后再震荡。

2) 通常涡旋震荡3-4次，每次5秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入30 μL 裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

1.5 65℃孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。

注意：如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。

1.6 加入150 μL 异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至看到DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要。如果样品中白细胞含量少，可能看不到DNA，则至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。

1.7 10,000 $\times\text{g}$ 离心3分钟。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

1.8 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

注意：少数时候沉淀可能贴壁不牢，注意不要吸弃沉淀。

1.9 加入300 μL 70%乙醇，涡旋震荡5秒，10,000 $\times\text{g}$ 离心3分钟，弃上清。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

1.10 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

注意：在管底可见白色的DNA沉淀，在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

【检验方法】

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10 mg/ml，-20℃保存。

	500次/盒	2000次/盒
蛋白酶K保存液	加入0.3 mL	加入1.25 mL

1. 从100-900 μ L全血中提取基因组（以300 μ L血液处理量为例）

1.1 取300 μ L全血于2 mL离心管（自备）中，加入300 μ L（样本等体积）红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，10,000 \times g离心20秒，弃上清。

1.2 再向离心管中加入450 μ L（1.5倍样本体积）红细胞裂解液，涡旋震荡，使沉淀完全分散。10,000 \times g离心20秒，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上放置2分钟。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。将离心管倒置在吸水纸上，可以减少管壁上清的回流。

1.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶K的混合液（比例100:1）。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后1小时之内用完。

1.4 加入150 μ L 裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：1) 如果有多个样品同时操作，加入裂解缓冲液/蛋白酶K混合液后立即涡旋震荡，不要等所有样品都加完后再震荡。

2) 通常涡旋震荡3-4次，每次5秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入30 μ L裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

1.5 65℃孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。

注意：如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。

1.6 加入150 μ L异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至看到DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要。如果样品中白细胞含量少，可能看不到DNA，则至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。

1.7 10,000 \times g离心3分钟。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

1.8 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

注意：少数时候沉淀可能贴壁不牢，注意不要吸弃沉淀。

1.9 加入300 μ L 70%乙醇，涡旋震荡5秒，10,000 \times g离心3分钟，弃上清。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

1.10 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

注意：在管底可见白色的DNA沉淀，在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

2.11 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验，但避免过度干燥DNA沉淀，因过度干燥会使DNA难于溶解。

2.12 加入300 μL 洗脱缓冲液，低速涡旋5秒，65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。

注意：如果DNA没有完全溶解，可室温过夜。如果使用少量的洗脱缓冲液溶解DNA，建议延长孵育时间。

3. 从6-20 mL全血中提取基因组（以10 mL血液处理量为例）

3.1 取10 mL全血于50 mL离心管（自备）中，加入10 mL（样本等体积）红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，2,500 $\times\text{g}$ 离心5分钟。

3.2 再向离心管中加入15 mL（1.5倍样本体积）红细胞裂解液，涡旋震荡，使沉淀完全分2,500 $\times\text{g}$ 离心5分钟，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上，放置2分钟。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

3.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶K的混合液（比例100:1）。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后1小时之内用完。

3.4 加入5 mL裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：1) 如果有多个样品同时操作，加入裂解缓冲液/蛋白酶K混合液后立即涡旋震荡，不要等所有样品都加完后再震荡。

2) 通常涡旋震荡3-4次，每次5秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入1 mL裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

3.5 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。

注意：如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。

3.6 加入5 mL异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至看到DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要，应该至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。

3.7 2,500 $\times\text{g}$ 离心5分钟。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

3.8 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

注意：在管底可见白色的DNA沉淀，在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

3.9 加入5 mL 70%乙醇，涡旋震荡5秒，2,500 $\times\text{g}$ 离心3分钟，弃上清。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

3.10 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

3.11 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验，但避免过度干燥DNA沉淀，因过度干燥会使DNA难于溶解。

3.12 加入1 mL洗脱缓冲液，低速涡旋5秒，65℃孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。
-20℃保存DNA。

注意：如果DNA没有完全溶解，可室温过夜。如果使用少量的洗脱缓冲液溶解DNA，建议延长孵育时间。

附表：不同体积血液所需各种缓冲液用量

	血液样品的体积 (μL)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
红细胞裂解液 (μL)	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
裂解缓冲液 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000
蛋白酶K (μL)	0.5	1.5	5	15	25	50	100
异丙醇 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000
70%乙醇 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000
洗脱缓冲液 (μL)	100	200	200	300	500	1000	1000

【注意事项】

1. 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。
2. 所有离心操作均在室温下完成。
3. 血液样品反复冻融，会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。所得基因组DNA也应尽可能避免反复冻融，以免断裂。