



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】

20次/盒； 50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】

本试剂盒采用优化的缓冲体系使裂解缓冲液中的DNA高效特异地结合到硅基质吸附柱上，PCR和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可得到高纯度DNA。纯化得到的DNA可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

【主要组成成分】

试剂名称	20次/盒		50次/盒	
	规格	数量	规格	数量
裂解缓冲液1	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1（浓缩液）	5.5 mL/瓶	1瓶	13 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2（浓缩液）	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	10 mg/支	1支	25 mg/支	1支
蛋白酶K 保存液	0.5 mL/支	1支	1.25 mL/支	1支
吸附柱	20 个/包	1包	50 个/包	1包

需要实验者自行准备的试剂：无水乙醇（分析纯）。

【储存条件及有效期】

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：新鲜或冷冻的动物组织、细胞、血液、细菌等样本。
2. 样本处理与保存：血清及血浆样本按常规方法制备，新鲜样本应尽快处理或分装后于-70℃冻存，避免反复冻融。
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20 mg/mL，-20℃保存。

	20次/盒	50次/盒
蛋白酶K保存液	加入0.5 mL	加入1.25 mL

1. 血液及细胞样本基因组提取

材料处理。

1.1

如果提取材料为哺乳动物抗凝血液（无核红细胞），可直接向50-200 μL 新鲜或冷冻的抗凝血液样品中加入裂解缓冲液1补足至200 μL 。

如果提取材料为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，取5-10 μL 新鲜或冷冻的抗凝血液样品，加入裂解缓冲液1补足至200 μL 。

贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5×10^6 个细胞），2,000 rpm (40 \times g) 离心5分钟，弃尽上清，加200 μL 裂解缓冲液1，振荡至样品彻底悬浮。

注意：如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μL 浓度为100 mg/m的 RNase A溶液，涡旋15秒，室温放置2分钟。

加入20 μL 蛋白酶K溶液。

1.2

加入200 μL 裂解缓冲液2，涡旋震荡充分混匀，56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟。

1.3

短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入200 μL 无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。短暂离心。

注意：1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。

2) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织在加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。

将上一个步骤中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 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。

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。

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），12,000 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。

注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤1.7。

12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。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酶促反应（酶切、PCR等）。

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加入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 $^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 洗脱缓冲液在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 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，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μL ，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μg ，推荐用50 μL 洗脱缓冲液或灭菌水洗脱。

4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用洗脱缓冲液洗脱并于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 动物组织基因组提取

2.1 材料处理：如提取材料为动物组织，取25 mg（脾组织用量应少于10 mg）；如材料为鼠尾，取一段长度为0.4-0.6 cm的大鼠鼠尾或两段长度为0.4-0.6 cm的小鼠鼠尾。

2.1.1 样本进行液氮研磨或切成小块后置于1.5 mL离心管中，加入180 μ L裂解缓冲液1，将不同样品做好标记。

2.1.2 若使用匀浆器处理样本，匀浆前向样本中加入不超过80 μ L裂解缓冲液1，匀浆后加入100 μ L裂解缓冲液1。

注意：1) 确保各组织的量不要超出推荐范围。

2) 组织样本在加入裂解缓冲液1之前用液氮研磨或加入裂解缓冲液1用匀浆器匀浆处理，可以增加裂解效率。

2.2 加入20 μ L蛋白酶K溶液，涡旋震荡使样品彻底混匀。56 $^{\circ}$ C水浴，直至组织完全裂解，孵育过程中可每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样品分散。

注意：1) 不同组织的消化时间不同，通常1-3小时即可完成，鼠尾需要消化6-8小时，必要时过夜消化，不会影响后续操作。

2) 如果孵育和涡旋震荡后仍然有胶状物质，延长56 $^{\circ}$ C孵育时间或再加入20 μ L蛋白酶K溶液消化。

3) 如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ L的浓度为100 mg/m的I RNase A溶液，涡旋15秒，室温放置5-10分钟。

2.3 加入200 μ L裂解缓冲液2，涡旋震荡充分混匀，70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。短暂离心后加入200 μ L无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

注意：1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。

2) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织（如脾，肺）在加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。

2.4 短暂离心，将步骤2.3所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm（ \sim 13,400 \times g）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。

2.5 向吸附柱中加入500 μ L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。

2.6 向吸附柱中加入500 μ L漂洗缓冲液2（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。

注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤2.6。

2.7 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。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酶促反应（酶切、PCR等）。

2.8 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加入50-200 μ L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 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 洗脱缓冲液在65-70°C水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 μ L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，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μ L，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μ g，推荐用50 μ L洗脱缓冲液或灭菌水洗脱。

4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用洗脱缓冲液洗脱并于-20°C保存。

3. 细菌基因组提取

3.1 细菌样本预处理

3.1.1 革兰氏阴性菌

3.1.1.1 取细菌培养物1-5 mL（ 10^6 - 10^8 个细胞，最多不超过 2×10^9 个细胞）置于离心管（自备）中，12,000 rpm离心1分钟，尽量吸净上清。

3.1.1.2 向沉淀中加入180 μ L裂解缓冲液1，振荡使菌体重悬。

3.1.1.3 加入20 μ L蛋白酶K溶液，涡旋混匀，56°C孵育，直至菌体完全裂解，孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

注意：如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ L浓度为100 mg/m的I RNase A溶液，震荡混匀，室温放置5-10分钟。

3.1.1.4 加入200 μ L裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀。

3.1.2 革兰氏阳性菌

3.1.2.1 取细菌培养物1-5 mL（ 10^6 - 10^8 个细胞，最多不超过 2×10^9 个细胞）置于离心管（自备）中，12,000 rpm离心1分钟，尽量吸净上清。

3.1.2.2 加入180 μ L溶菌酶缓冲液（自备）使菌体重悬。

3.1.2.3 37°C孵育30分钟。

3.1.2.4 加入20 μ L蛋白酶K溶液涡旋震荡，充分混匀。加入200 μ L裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀。56°C孵育30分钟。

注意：1) 如果需要，95°C孵育15分钟可以使病原体失活，但是95°C孵育会造成一些DNA的降解。

2) 如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ L浓度为100mg/mL的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置5-10分钟。

3.2 加入200 μ L无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

注意：加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

3.3 将步骤3.2所得溶液（包括形成的沉淀）全部加入到已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。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。

- 3.4 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。
- 3.5 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），12,000 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。
- 注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤3.5。**
- 3.6 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。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酶促反应（酶切、PCR等）。
- 3.7 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加入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) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。**
- 2) 洗脱缓冲液在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 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，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μL ，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μg ，推荐用50 μL 洗脱缓冲液或灭菌水洗脱。**
- 4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用洗脱缓冲液洗脱并于 -20°C 保存。**

【注意事项】

1. 提取革兰氏阳性菌基因组DNA时须准备溶菌酶缓冲液。配方为：20 mM Tris, pH8.0; 2 mM Na₂-EDTA ; 1.2% Triton X-100; 终浓度为20 mg/mL的溶菌酶。
2. 配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，以免影响其活性。
3. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量也下降。
4. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。
5. 第一次使用前应按照试剂瓶标签说明在漂洗缓冲液1（浓缩液）和漂洗缓冲液2（浓缩液）中加入无水乙醇。
6. 使用前请检查裂解缓冲液1和裂解缓冲液2是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将裂解缓冲液1和裂解缓冲液2于56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育重新溶解。
7. 如果下游实验对RNA污染比较敏感，可以在加入裂解缓冲液2前加入4 μL DNase-Free的RNase A（100 mg/mL）。