



核酸提取试剂使用说明书

【产品名称】

产品通用名称：核酸提取试剂

产品商用名称：**全血基因组DNA快速提取试剂盒（离心柱型）**

【包装规格】

DP1801（50次）/DP1802（100次）/DP1803（200次）

【预期用途】

用于核酸的提取、富集、纯化等步骤。其处理后的产物用于酶切、PCR/文库构建、Southern杂交等各种常规实验，和芯片杂交、高通量测序等高质量DNA需求的实验。

【检验原理】

独特的结合液/蛋白酶K迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组DNA在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤，将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组DNA从硅基质膜上洗脱。

【主要组成成分】

试剂盒由平衡液，缓冲液BB，结合液CB，抑制物去除液IR，漂洗液WB，洗脱缓冲液EB，异丙醇，蛋白酶K，进口吸附柱AC，收集管（2 mL），使用说明书和合格证组成。主要组分及储存条件见表1。

表1 试剂盒组成、储存

试剂盒组成	DP1801	DP1802	DP1803	保存
平衡液	25 mL	50 mL	100 mL	室温
缓冲液BB	15 mL	30 mL	60 mL	室温
结合液CB	15 mL	30 mL	60 mL	室温
抑制物去除液IR	27 mL	50 mL	100 mL	室温
漂洗液WB	15 mL	25 mL	50 mL	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇			

洗脱缓冲液 EB	15 mL	20 mL	40 mL	室温
异丙醇	7 mL	15 mL	30 mL	室温
蛋白酶 K (20mg/mL) (可选)	20mg x 2 冻干粉	20mg x 4 冻干粉	20mg x 8 冻干粉	-20°C
进口吸附柱 AC	50 个	100 个	200 个	室温
收集管 (2mL)	50 个	100 个	200 个	室温

注：第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

【实验所需试剂但未提供的物品】

* 无水乙醇

【储存条件及有效期】

1、溶解后的蛋白酶 K 按照每次使用量 (40 μ L) 分装，-20°C 保存，经常使用可以放在 4°C 储存；其余试剂室温保存。

2、本试剂盒有效期一年，请在有效期内使用。

3、为了避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

【适用仪器】

本产品可适用于匹配 1.5/2.0 mL 离心管的离心机，比如百泰克 CK1260。

【样本要求】

本试剂盒可运用于多种抗凝剂的全血，如 EDTA，柠檬酸，肝素抗凝血。其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4°C 存放小于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。

【使用方法】

以 200 μ l 全血提取举例

* 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇！

1. (可选步骤) 柱平衡步骤：向吸附柱 AC 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μ L 的平衡液，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的下滤液，将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子。柱平衡后有助于核酸得量的提升。)

2. 取 200 μ L 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，放入 1.5mL 离心管。

对如果全血起始量小于 200 μ l，则用缓冲液 BB 补足到 200 μ l。（禽类血液取 10 μ L 加 190 μ L PBS 缓冲液补足至 200 μ L）如果起始量介于 200 μ l-300 μ l 之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于 300 μ l-1 毫升之间，则需要先进行红细胞裂解操作（见本说明书后附录）。

3. 加入 40 μ l 蛋白酶 K (20mg/mL)溶液，室温 15 分钟（期间颠倒混匀几次）加入 200 μ l 结合液 CB，立刻涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟，溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

4. 加入 100 μ l 异丙醇，涡旋混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

上述各操作步骤中适当力度充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 秒混匀，但不可用手剧烈振荡，以免剪切 DNA。

5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个进口吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）10,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。

6. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。

7. 加入 700 μ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

8. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

9. 将进口吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出进口吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热），室温放置 3-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

11. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

附录（以 300 μ l，1mL 全血举例红细胞裂解操作）

1. 吸取 900 μ l 红细胞裂解液（可向本公司购买 SP3301）到一个 1.5mL 离心管或者 3mL 红细胞裂解液到一个 15mL 离心管。

2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300 μ l 全血和 1mL 全血分别加到上述 1.5mL 和 15mL 离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。

3. 室温放置 10 分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。

4. 12,000 rpm 离心 20 秒（对于 1.5mL 离心管），3,000-4,000 rpm 离心 5 分钟（对于 15mL 离心管）倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约 10 μ l 的残留上清。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入红细胞裂解液重悬细

胞团后重复步骤 3, 4。

5. 加入 200 μ l 缓冲液 BB 涡旋振荡重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响后续实验裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。

6. 现在可以按照操作步骤提取全血基因组 DNA 了。

【产品性能指标】

1. pH 值:

在 25°C \pm 2°C条件下测定，以下组分的 pH 值需满足下表要求:

组分名称	pH 值
缓冲液 BB	8.0 \pm 0.2
结合液 CB	4.4 \pm 0.2
抑制物去除液 IR	6.6 \pm 0.2
漂洗液 WB	7.5 \pm 0.2
洗脱缓冲液 EB	8.5 \pm 0.2

2. 核酸提取效果：

1 1 mL 新鲜全血 DNA 得率可达 15-30 μ g

2 OD260/280 比值可达 1.7-1.9

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机，比如百泰克CK1260。

2. 典型的产量200 μ l全血可提取出3-6 μ g基因组DNA(不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此产量的个体差异也可能非常大)。

3. 开始实验前将需要的水浴先预热到70°C备用。

4. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者4°C存放少于3天的标本，不要使用反复冻融超过3次的标本，否则会严重降低产量。

5. 结合液CB或者抑制物去除液IR低温时可能出现析出和沉淀，可以在37°C水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。

6. 为避免降低活性，方便运输，提供蛋白酶K为冻干粉状，收到后，可短暂离心后，加入1毫升灭菌水溶解。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量(40微升)分装冻存，-20°C保存。

【疑难解答】

标本中含有血凝块

不恰当的存放标本，未充分混匀，未使用合适的抗凝收集管

红细胞裂解不完全

血液标本裂解前没有恢复到室温

裂解时间不够

裂解过程中没有多次混匀

DNA产量低

血液标本中本身含有的白细胞数量低

血液标本存放时间太长

蛋白酶K失效了

裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀

洗脱效率不高

DNA下游酶切不能切开或者酶切不完全

忘记做步骤9，乙醇抑制了酶切反应

一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应

DNA长度小于15kb

血液样品太老或者不正确的存放，造成DNA降解

操作不当，造成对基因组DNA的剪切

A₂₆₀吸光值异常偏高

一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值

洗脱下来的DNA溶液还带有轻微的颜色

漂洗不完全

【生产企业】

企业名称：无锡百泰克生物技术有限公司

注册地址：无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

生产地址：无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

邮政编码：214100

电话/传真：400-6788982

网址：www.bioteke.cn

【说明书核准及修改日期】

说明书修改日期 2019 年 03 月 14 日