

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（商品名：血液 DNA 小量提取试剂盒）

[包装规格] 250T

[预期用途] 用于血液样品核酸的提取/富集/纯化等步骤。

[检验原理]

试剂盒基于吸附柱纯化技术，在提取过程中根据 DNA 吸附柱特定条件下与核酸特异性结合的特点，达到快速分离纯化核酸的效果。快速分离纯化过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 40~60 分钟，提取的 DNA 纯度高，稳定性好。得到的 DNA 可直接用于 PCR 及其他下游实验。

[主要组成成分]

型号	DNB301-03 (250T)	组成成分
DNA Extraction Mini Columns II	250	硅胶膜
2ml Collection Tubes	250	收集管
Buffer MBL	80 ml	胍盐
Buffer W1A	66 ml	胍盐
Buffer W2A	2 x40 ml	Tris
Proteinase K	5.5 ml	蛋白酶 K
Buffer EB	50 ml	Tris

[自备试剂]

无水乙醇

[储存条件及有效期]

- A. 试剂盒可在常温保存。
- B. 有效期：本试剂盒有效期 12 个月，请在有效期内使用。
- C. 加入乙醇：按标签所示加入适量的无水乙醇稀释 Buffer W1A/W2A，轻轻颠倒让其充分混匀。

[样本要求]

样本的采集、运输及保存符合相关操作规范。

[检验方法]

1. 抗凝血液样品

1. 转移 250 μ l 血液样品及 20 μ l Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。

若样品超过 250 μ l，加入 3 倍体积红细胞裂解液，颠倒数次混匀，静置 3 分钟。之后 2000 \times g 离心 5 分钟，倒弃上清液，吸尽残液留下白细胞沉淀。向沉淀中加入 250 μ l PBS 或灭菌水涡旋打散样品，之后加入 20 μ l Proteinase K，进行下一步操作。

2. 加入 250 μ l Buffer MBL 至离心管中，颠倒混匀充分，高速涡旋 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。按过柱纯化进行操作。

该步骤必须涡旋混匀，若未涡旋混匀即加热会导致提取的 DNA 产量及纯度大大下降。

B. 培养细胞的消化裂解(不超过 5×10^6)

1. 计算细胞数量。2,000 \times g 离心 5 分钟收集细胞，小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 250 μ l PBS 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋 10 秒重悬细胞。
3. 加入 250 μ l Buffer MBL 至细胞重悬液中，充分颠倒混匀，高速涡旋 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。按过柱纯化进行操作。

C. 液体样品(拭子保存液样品、唾液、胸水等)

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 20 μ l Proteinase K。
2. 加入 250 μ l 样品，加入 250 μ l Buffer MBL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。

3. 按过柱纯化进行操作。

过柱纯化

4. 加入 250 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。

处理 DNA 丰富的样品，加入乙醇时会有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。

5. 把 DNA Extraction Mini Columns II 装在 2ml 收集管中。转移混合液(包括沉淀)至柱子中。13,000 \times g 离心 1 分钟。

若柱子出现堵塞，14,000 \times g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 μ l，分次过柱。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W1A 至柱子中。13,000 \times g 离心 10 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 \times g 离心 10 秒。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 \times g 离心 10 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 μ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30 μ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。

11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C。

[注意事项]

- 1) Buffer W1A/W2A 中必须加入无水乙醇。
- 2) 加入 Buffer MBL 后必须充分涡旋混匀，对产量的影响尤其重要。
- 3) 可将洗脱液预热至 65℃后再进行洗脱，提高洗脱效率。