



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I（磁珠法）：50次/盒；96次/盒

型号II（柱式法）：50次/盒；96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】

本试剂盒基本原理为使用裂解管和裂解液实现病原微生物的裂解及核酸释放，磁珠或硅基质吸附柱可以特异地吸附核酸，通过洗涤，去除核酸以外的杂质，洗脱液解离吸附在磁珠吸附柱上的核酸，得到纯度和浓度均很高的DNA/RNA。用本试剂盒纯化的微生物DNA及RNA适用于多种下游应用，包括全基因组测序分析、基于16SrDNA的高灵敏度微生物组分析，以及宏基因组鸟枪法测序分析。

【主要组成成分】

型号I (磁珠法)

试剂名称	主要成分	50次/盒		96次/盒	
		规格	数量	规格	数量
裂解管	玻璃珠	50 支/包	1 包	96 支/包	1 包
裂解缓冲液	胍盐	25 mL/瓶	1 瓶	50 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液1	去RNA酶水	50 mL/瓶	1 瓶	100 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液2	去RNA酶水	50 mL/瓶	1 瓶	100 mL/瓶	1 瓶
洗脱缓冲液	去RNA酶水	5 mL/瓶	1 瓶	10 mL/瓶	1 瓶
磁珠悬浮液	磁珠	1 mL/支	1 支	1 mL/支	2 支
蛋白酶K	酶	1.25 mL/支	2 支	1.25 mL/支	4 支

需要实验者自行准备的试剂：异丙醇。

型号II (柱式法)

试剂名称	主要成分	50次/盒		96次/盒	
		规格	数量	规格	数量
裂解管	玻璃珠	50 支/包	1 包	96 支/包	1 包
裂解缓冲液1	胍盐	25 mL/瓶	1 瓶	50 mL/瓶	1 瓶
裂解缓冲液2	胍盐	25 mL/瓶	1 瓶	50 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液1	去RNA酶水	50 mL/瓶	1 瓶	100 mL/瓶	1 瓶
漂洗缓冲液2	去RNA酶水	50 mL/瓶	1 瓶	100 mL/瓶	1 瓶
洗脱缓冲液	去RNA酶水	5 mL/瓶	1 瓶	10 mL/瓶	1 瓶
蛋白酶K	酶	1.25 mL/支	1 支	1.25 mL/支	2 支
吸附柱	/	50 支/包	1 包	48 支/包	2 包

需要实验者自行准备的试剂：异丙醇

【储存条件及有效期】

0-35°C保存，有效期12个月。

可在0-40°C运输，运输时间建议不超过7天。

【自备仪器、试剂】

1. 恒温混匀仪——货号：CW2593
2. 2/15 mL磁力架——货号：CW2594
3. 江苏康为世纪生物科技股份有限公司CWE3200、CWE2100全自动核酸提取仪。
4. 96孔深孔板—货号：CW2523、8联深孔磁套—货号：CW2524。
5. 异丙醇。
6. 1.5 mL无RNA酶离心管。

【样本要求】

1. 本试剂盒适用于血浆、血清、肺泡灌洗液、组织匀浆液等体液样本中纯化和富集病毒、细菌和真菌病原微生物DNA及RNA。
2. 样本处理与保存：本试剂盒旨在从完整的微生物细胞中分离DNA及RNA，为保证微生物DNA及RNA最佳回收效率，样品应保证新鲜。如果需要储存或运输，最好在2~8°C条件下进行，不可冻融，冻融会损坏微生物细胞的完整性。

【检验方法】

1. 使用前准备

使用前请检查裂解液是否出现沉淀，如有沉淀出现，请置于56°C水浴重新溶解。

2. 手动提取

柱式法

1. 样本前处理：

- 1a: 尿液、胸腹水、脑脊液等非粘稠体液样本
直接取400 μ L样本，进行第2步操作。

1b: 拭子类样本（如鼻、咽及肛拭子等）

涡旋振荡混匀后，直接取400 μL 进行第2步实验。

1c: 痰液、肺泡灌洗液样本

取适量液化痰液样本至1.5 mL 离心管中（液化方法推荐使用1.5倍体积的Buffer GB1，本试剂盒不提供），12,000 rpm离心5 min，弃上清，使用400 μL PBS重悬沉淀后提取。对于含有少量粘稠痰液的肺泡灌洗液，将尽量多的肺泡灌洗液样本先进行离心，小心去除上清，留取下层粘稠部分（含痰液、细胞、菌体）参照痰液样本进行液化处理。

1d: 血液类样本

血清、血浆及少量全血样本（少于200 μL ）可直接取400 μL （少量全血使用PBS补足）进行第2步实验，大体积全血样本推荐使用红细胞裂解液（CW0613）处理后再进行提取。

2. 在裂解管中加入400 μL 样本、20 μL 蛋白酶K和400 μL 裂解缓冲液1，于恒温混匀仪上以65°C最大转速（2500~2900 rpm）处理10 min。短暂离心后加入400 μL 裂解缓冲液2，继续65°C最大转速（2500~2900 rpm）震荡处理10 min。
3. 室温12000 rpm离心1min，小心吸取全部上清至新离心管中，并加入400 μL 异丙醇，涡旋混匀，瞬时离心使溶液收集至管底。
4. 将步骤3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，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。
5. 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液1，12,000 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。重复此步骤一次。
6. 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液2，12,000 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。重复此步骤一次。
7. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，彻底晾干（5~10 min）。
8. 将吸附柱置于一个新离心管（自备）中，向吸附柱中间部位悬空加入70 μL 洗脱缓冲液，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集核酸溶液，-20°C保存。

磁珠法

1. 样本前处理:

1a: 尿液、胸腹水、脑脊液等非粘稠体液样本

直接取400 μL 样本，进行第2步操作。

1b: 拭子类样本（如鼻、咽及肛拭子等）

涡旋振荡混匀后，直接取400 μL 进行第2步实验。

1c: 痰液、肺泡灌洗液样本

取适量液化痰液样本至1.5 mL 离心管中（液化方法推荐使用1.5倍体积的Buffer GB1, 本试剂盒不提供），12,000 rpm离心5 min，弃上清，使用400 μ L PBS重悬沉淀后提取。对于含有少量粘稠痰液的肺泡灌洗液，将尽量多的肺泡灌洗液样本先进行离心，小心去除上清，留下层粘稠部分（含痰液、细胞、菌体）参照痰液样本进行液化处理。

1d: 血液类样本

血清、血浆及少量全血样本（少于200 μ L）可直接取400 μ L（少量全血使用PBS补足）进行第2步实验，大体积全血样本推荐使用红细胞裂解液（CW0613）处理后再进行提取。

2. 向裂解管中加入400 μ L样本和400 μ L 裂解缓冲液，可用以下振荡方式处理：
 - a) 将Lysis Tubes置于室温涡旋振荡10 min；
 - b) 将Lysis Tubes置于恒温混匀仪上以最大振速（2500~2900 rpm）处理10 min；
 - c) 将Lysis Tube 置于样本均质仪中，可根据不同品牌的仪器选择合适的程序进行裂解：如使用MP公司FastPrep-24-5G（6 M/S的速度振荡30 sec，间隔30 sec，共6个循环）。
3. 室温12000 rpm离心1 min，将600 μ L上清转移至新的离心管中，加40 μ L 蛋白酶K（若经过去宿主处理，则此步需再加20 μ L蛋白酶K），涡旋震荡混匀5 s后，置于65°C 600 rpm孵育10 min。
4. 瞬离离心管，确保管壁无液体残留后，在离心管中加入20 μ L 磁珠悬浮液和300 μ L异丙醇，涡旋5 s后，室温，1500 rpm孵育5 min。
注：磁珠悬浮液使用前，涡旋以保证充分重悬。
5. 瞬离离心管，确保管壁无液体残留后，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
6. 在离心管中，加入500 μ L漂洗缓冲液1，室温，1500 rpm孵育3 min，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
7. 重复步骤6一次。
8. 在离心管中，加入500 μ L漂洗缓冲液2，室温，1500 rpm孵育3 min，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器小心吸弃所有上清。
9. 重复步骤8一次。
10. 离心管放置于磁力架上，敞盖晾干5 min。
11. 在离心管中加入70 μ L 洗脱缓冲液，用移液器吹打混匀，置于56°C 600 rpm孵育5 min。瞬离离心管后，将离心管置于磁力架上静置2 min或至磁珠完全吸附，用移液器转移所有上清至新离心管中。获得的核酸溶液置于-20°C长期保存。

3. 自动化提取

1. 样本前处理同手动操作步骤1。
2. 在裂解管中加入400 μL 样本、400 μL 裂解缓冲液，室温振荡10 min，振荡方法同手动操作步骤2，室温12000 rpm离心1 min。
3. 按照下表在96深孔板中分装试剂

位置	试剂	体积
第 1、7 列	异丙醇	300 μL
第 2、8 列	漂洗缓冲液1	500 μL
第 3、9 列	漂洗缓冲液1	500 μL
第 4、10 列	漂洗缓冲液2 磁珠悬浮液	500 μL 20 μL
第 5、11列	漂洗缓冲液2	500 μL
第 6、12 列	洗脱缓冲液	70 μL

4. 在分装好试剂的96深孔板第1、7列中加入步骤1中600 μL 上清样本、40 μL 蛋白酶K（若经过去宿主处理，则此步需再加20 μL 蛋白酶K）。
5. 按照下表编辑并运行提取程序：

步序	磁棒位置	步骤名称	温度	释放磁珠	搅拌速度	时间	循环次数	磁吸次数	磁吸时间
1	1	裂解	65 $^{\circ}\text{C}$	是	中速	10min	1	0	0
2	4	收集磁珠	0	否	快速	5 s	1	2	10s
3	1	结合	0	是	中速	5 min	1	2	10s
4	2	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10s
5	3	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10s
6	4	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10s
7	5	漂洗	0	是	快速	2 min	1	2	10s
8	5	干燥	0			5 min			
9	6	洗脱	56 $^{\circ}\text{C}$	是	中速	5 min	1	3	10s
10	3	释放磁珠	0	是	快速	5 s			

6. 程序运行结束后，取出96深孔板，将第6、12列中的洗脱缓冲液转移至新离心管中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

【注意事项】

1. 为避免由于污染造成的错误结果，请保持工作区域清洁和穿防护服，并合理设置对照品进行质控。采用适当措施处理样品材料，降低交叉污染的风险。提取过程中，使用DNA/RNA-free的移液器吸头和消耗品，试剂使用完后立即盖好瓶盖，防止污染。
2. 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。
3. 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。
4. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取得率低。
5. 不要使用超过有效期的试剂。