核酸提取纯化试剂：组织样品基因组 DNA 提取试剂盒说明书

【产品名称】

核酸提取纯化试剂

【型号规格】

组织样品基因组 DNA 提取试剂盒

【包装规格】

96 次/盒

【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临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒采用磁珠分离技术，利用本公司专利纤维素磁珠的亲疏水性差异进行核酸分离纯化的原理，结合本公司生产的核酸纯化仪平台，从各种动物组织或细胞中快速高效的提取基因组 DNA。

【主要组成成分】

组织样品基因组 DNA 提取试剂盒	96 次/盒
裂解液	500μl
结合液	1000μl
磁珠混合液	500μl
洗涤液 1	1000μl
洗涤液 2	1000μl
ddH_2O	1000μl
洗脱液	1000μl

【储存条件及有效期】

室温条件下避光储存。

有效期：12 个月。

【适用仪器】

本公司生产的全自动核酸纯化仪

【样本要求】

各种动物组织或细胞。

【检验方法】

一、预处理：

对于石蜡包埋组织：

附加要求：二甲苯（或替代品），乙醇（96-100％），微量离心管。

建议二甲苯替代品：A5597（Sigma），Neo-Clear（Merck），CitriSolv（Fisher）。

1. 将石蜡包埋的组织切片(5-10μm)，并转移到微量离心管中。若石蜡样品的表面已经暴露在空气中，则弃去 2-3 段最初切片。

2. 加入 1mL 二甲苯（或替代品），剧烈涡旋 10 秒混匀。然后 60℃孵育 10 分钟。

3. 室温下全速离心 3 分钟。

4. 小心吸除上清液，加入 1mL 乙醇（96-100％），涡旋 10 秒混匀。

5. 室温下全速离心 5 分钟。

6. 小心吸除上清液，再次加入 1mL 乙醇（96-100％），涡旋 10 秒混匀再次清洗。

7. 全速离心 5 分钟。

8. 用细枪头吸除残留的乙醇，打开离心管在 55℃下孵化 5 分钟，直到所有残留的乙醇完全蒸发。

9. 加入 400μLGT 缓冲液和 20μL 蛋白酶 K（10mg/mL）,涡旋混匀。

10. 在 56℃下孵育 90 分钟，直至样品完全裂解，然后在 90℃下孵育 30 分钟。

11. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

12. 吸取 400μL 澄清组织液到样品管中。

对于棉签样本：

附加要求：微量离心管。

1. 从棉签棒中分离棉花。将拭子放入 2ml 的离心管中，加入 500μL 甚至更多的 GT 缓冲液和 20μL 蛋白酶 K（10mg/mL）。

2. 在 56℃下孵育 30 分钟使其裂解。对于口腔拭子样本，供体不应该至少在样品采集 30 分钟之前摄取任何东西

3. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

4. 吸取 400µL 澄清组织液到样品管中。

对于固体动物组织：

附加要求：微量离心管。

1. 将固体组织切成小片，放入微量离心管中。

2 .加入 400µL GT 缓冲液和 20µL 蛋白酶 K（10mg/mL）,涡旋混匀。

3. 在 56℃下孵育 90 分钟，直至样品完全裂解。

4. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

5. 吸取 400µL 澄清组织液到样品管中。

对于粪便样品：

附加要求：微量离心管。

1. 称量 180-200mg 粪便样品置于 2mL 的放在冰上的离心管中，如果样品是液体，吸 200µL 入离心管内。切去吸管尖底，使移液更容易。如果样品被冻住，请在冰上使用手术刀或刮刀刮取少量粪便于离心管中。

2. 样品中加入 1.5mL GT 缓冲液，连续涡旋 1 分钟，或直至粪便样品彻底均化，彻底涡旋样品对于确保最终的洗脱液获得最大 DNA 浓度非常重要。

3. 在 70℃下孵育悬浮液 5 分钟，。此步骤可以增加 DNA 回收率 30-50%，如果目标样品是革兰氏阳性细菌，请在 95℃条件下使细胞裂解。

4. 涡旋 15 秒并全速（13000 rpm）离心样品持续 1 分钟，以沉淀粪便颗粒。

5. 吸取 400µL 上清液到新的 1.5mL 离心管中。

6. 加入 20µL 蛋白酶 K（10mg/mL）的样品混合物，涡旋混合。60℃下孵育 2～3 小时以裂解样品。

7. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

8. 吸取 400µL 澄清组织液到样品管中。

对于饲料、土壤样品：

1. 将30～40mg的饲料或土壤样品置于1.5 ml离心管。

2. 依次加入20µL（10mg/mL）蛋白酶K溶液和500µLGT缓冲液于离心管内。轻轻涡旋直到粉末溶于GT缓冲液。

3. 在56℃下孵育该混合物15分钟。孵化期间每隔2～3mins反转管一次。通常孵育15分钟可裂解90％以上的细胞。延长孵育时间到20分钟可提高10％的产率。

4. 将混合物全速离心3分钟。

5. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心5分钟，用收集管收集澄清组织液。

6. 吸取 400µL 澄清组织液到样品管中。

对于干血片：

1. 用单孔打孔器从干血片打个直径 3mm 的血片，放入 1.5mL 的微量离心管中。

2. 离心管中加入400～500µL的GT缓冲液，并继续研磨均质化样品组织。

3. 加入20µL蛋白酶K（10mg/mL）于样品混合物中，涡旋混合。在60℃下孵育1小时使样品裂解。

4. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液

5. 吸取 400µL 样品混合物到样品管中

选择步骤：如果需要去除 RNA，在加蛋白酶 K 液前执行以下步骤：

1. 加入 4µLRNA 酶 A(需使用者自行配制，50mg/mL)到溶解的样品中。

2. 在室温中静置 20 分钟。

对于烟头样品：

样品制备

1. 从烟头或过滤嘴末端的外纸片切割 1cm² 的纸片，将这个纸片切成 6 小片并放到 1.5mL 的微量离心管中。

细胞裂解

1. 离心管中加入 500µL GT 缓冲液和 20µL 蛋白酶 K，盖上盖子，混合 10 秒钟，在 60℃下孵育 1 小时使样品裂解。

2. 短暂离心使盖子内部的液滴除去。

3. 吸取 400µL 澄清组织液于样品管中。

对于发根样品：

样品制备

1. 将发根切成 0.5-1cm 的长段，并把它们放到 1.5 mL 微量离心管中。

细胞裂解

1. 离心管中加入 500μL GT 缓冲液和 20μL 蛋白酶 K，盖上盖子，混合 10 秒钟，在 60℃下孵育 1 小时使样品裂解。

2. 短暂离心使盖子内部的液滴除去。

3. 吸取 400μL 澄清组织液于样品管中。

对于口香糖样品：

样品制备

1. 将 30mg 口香糖成小块，并把它们放到 1.5mL 微量离心管中。

细胞裂解

1. 离心管中加入 500μL GT 缓冲液和 20μL 蛋白酶 K，盖上盖子，混合 10 秒钟，在 60℃下孵育 1~3 小时使样品裂解

2. 短暂离心使盖子内部的液滴除去

3. 吸取 400μL 澄清组织液于样品管中。

对于槟榔渣样品：

样品制备

1.将 30mg 槟榔渣切成小块，并把它们放到 1.5mL 微量离心管中。

细胞裂解

1. 离心管中加入 500μL GT 缓冲液和 20μL 蛋白酶 K，盖上盖子，混合 10 秒钟，在 60℃下孵育 1~3 小时使样品裂解。

2. 短暂离心使盖子内部的液滴除去

3. 吸取 400μL 澄清组织液于样品管中。

对于唾液样本：

样本制备

1. 对于唾液样本，供体在样品采集前至至少 30 分钟内不能摄入任何东西。

2. 准备好 PBS 缓冲液和 15mL 管。

细胞裂解

1. 在 1mL 唾液样本中加入 4mL 的 PBS 缓冲液（需使用者自行配制）。

2. 在 1800×g 条件下离心 5 分钟，然后小心地移去上清液。

3. 用 400μL 的 GT 缓冲液重悬沉淀。

4. 加入 20μL 蛋白酶 K，盖上盖子，混合 10 秒钟，在 70℃下孵育 10 分钟使样品裂解。

5. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

6. 吸取 400μL 澄清组织液于样品管中。

对于酵母培养样品：

附加要求：山梨糖醇缓冲，溶细胞酶或消解酶，微量离心管。

山梨糖醇缓冲液的制备：1.2M 山梨糖醇，10mM 的 $CaCl_2$，0.1M 的 Tris-Cl，pH 值为 7.5，过滤灭菌后，储存在 4℃条件下.

样品制备

1. 5000×g 条件下离心 10 分钟收集 3ml 不超过 5×10^7 个的酵母细胞，弃去上清液并仔细吸除任何剩余的液体。

2. 用 600μL 山梨醇缓冲液（需使用者自行配制）重悬沉淀细胞

细胞裂解

1. 加入 200U Lyticase 或 Zymolase（需使用者自行配制）。在 30℃下孵育 30 分钟。将混合物在 2,000×g 下离心 10 分钟以收集原生质细胞。

2. 去除上清液，并加入 400μL GT 缓冲液，涡旋或使用吸管使细胞重悬沉淀。

3. 在 56℃下孵育 90 分钟，直至样品完全裂解。

4. 如果管内有任何不溶性的残留物，转移上清液至过滤柱，全速离心 5 分钟，用收集管收集澄清组织液。

5. 吸取 400μL 澄清组织液于样品管中。

二、上机操作：

对于 HF8/HF16 核酸纯化仪：

1. 于每次实验前先将核酸纯化仪电源开启，预热 20 min。

2. 从核酸纯化仪中依次取出 T 型架和试剂条架。

3. 参照核酸纯化仪说明书图示，将试剂条（Code 401）放入核酸纯化仪的试剂条架中。

4. 参照核酸纯化仪说明书图示，将经预处理后的样品管放入核酸纯化仪 T 型架的第 4 道，收集管放入 T 型架的第 1 道，吸头&吸头套放入 T 型架的第 2 道。

5. 先将试剂条架放入核酸纯化仪中，再放入 T 型架，使 T 型架压住试剂条。

6. 关闭核酸纯化仪前门。

7. 点击核酸纯化仪控制面板上的“Start”键，仪器将开始自动校准。

8. 待仪器自动校准完成后，输入试剂条的编码“401”，点击“Enter”键进入下一界面。

9. 确认试剂条编码、样品类型、上样体积显示无误后，点击“Enter”键进入下一界面。

10. 确认试剂条架和 T 型架放置正确后，点击“Enter”键进入下一界面。

11. 按数字键“1”（Pure water）或“2”（10mM Tris-HCl）选择洗脱缓冲液。

12. 按数字键“1”（200μL）、“2”（150μL）、“3”（100μL）或“4”（60μL）选择最终的洗脱体积，仪器即开始自动运行。

13. 仪器完成运行后，收集管中的液体即为提取的基因组 DNA，建议立即使用，否则请放置于-20 ℃冷冻保存。

14. 将使用过后的试剂条、吸头&吸头套、样品管置于生物垃圾袋中并进行妥善处理。

15. 实验完成后，点击核酸纯化仪控制面板上的“UV”键，然后按数字键“2”（30 min），开启仪器内部的紫外线灯照射 30 min，最后关闭核酸纯化仪电源。

注：仪器运行时间约为 33 min。

对于 HF16 Plus/ Super 核酸纯化仪：

1. 于每次实验前先将核酸纯化仪电源开启，预热 20 min。

2. 从核酸纯化仪中依次取出 T 型架和试剂条架。

3. 参照核酸纯化仪说明书图示，将试剂条放入核酸纯化仪的试剂条架中。

4. 参照核酸纯化仪说明书图示，将经预处理后的样品管放入核酸纯化仪 T 型架的第 1 道（W1），收集管放入 T 型架的第 5 道（W5），吸头放入 T 型架的第 3 道（W3），300μL 吸头放入 T 型架的第 4 道（W4）（需要用到 300μL 吸头时执行此动作）。。

5. 先将试剂条架垂直放入核酸纯化仪中，再放入 T 型架，使 T 型架压住试剂条。

6. 关闭核酸纯化仪前门。

7. 点击核酸纯化仪触控面板主界面上显示的“Start”。

8. 选择编号为“C1003 或 401”的核酸提取程序。

9. 根据样品上样体积选择“400μL”。

10. 根据需求选择洗脱缓冲液为“Pure water”或“10mM Tris-HCl”。

11. 根据需求选择最终的洗脱体积为“200μL”、“150μL”、“100μL”“60μL”或“30μL”。

12. 系统出现确认窗口，如果触控面板上显示的参数设置无误，请点击“Start”，程序即开始自动运行；如果显示的参数设置有误，请选择“Back”返回，然后修改设置有误的参数。

13. 仪器完成运行后，收集管中的液体即为提取的基因组 DNA，建议立即使用，否则请放置于-20 ℃冷冻保存。

14. 将使用过后的试剂条、吸头、样品管置于生物垃圾袋中并进行妥善处理。

15. 实验完成后，点击核酸纯化仪触控面板主界面上显示的“Maintenance”，选择“UV”，再选择“30min”，然后按“Start”，开启仪器内部的紫外线灯照射 30 min，最后关闭核酸纯化仪电源。

注：① Super 核酸纯化仪同时具备核酸质量检测功能，若需使用此功能，请于实验开始前仔细阅读该仪器的说明书，并按照仪器说明书的规定进行前期准备工作和上机操作。

② 当仪器运行时间约为 40 min。

对于 HF48 核酸纯化仪：

1. 于每次实验前先将核酸纯化仪电源开启，预热 20 min。

2. 从核酸纯化仪中依次取出 T 型架和试剂条架。

3. 参照核酸纯化仪说明书图示，将试剂条放入核酸纯化仪的试剂条架中。

4. 参照核酸纯化仪说明书图示，将经预处理后的样品管放入核酸纯化仪 T 型架的第 1 道（W1），收集管放入 T 型架的第 5 道（W5），吸头放入 T 型架的第 3 道（W3），300μL 吸头放入 T 型架的第 4 道（W4）（需要用到 300μL 吸头时执行此动作）。。

5. 先将试剂条架垂直放入核酸纯化仪中，再放入 T 型架，使 T 型架压住试剂条。

6. 关闭核酸纯化仪前门。

7. 点击核酸纯化仪触控面板主界面上显示的“Start”。

8. 选择编号为“C1003 或 401”的核酸提取程序。

9. 根据样品上样体积选择“400μL”。

10. 根据需求选择洗脱缓冲液为“Pure water”或“10mM Tris-HCl”。

11. 根据需求选择最终的洗脱体积为“200μL”、“150μL”、“100μL” “60μL”或“30μL”。

12. 系统出现确认窗口，如果触控面板上显示的参数设置无误，请点击“Start”，程序即开始自动运行；如果显示的参数设置有误，请选择“Back”返回，然后修改设置有误的参数。

13. 仪器完成运行后，收集管中的液体即为提取的基因组 DNA，建议立即使用，否则请放置于-20 ℃冷冻保存。

14. 将使用过后的试剂条、吸头、样品管置于生物垃圾袋中并进行妥善处理。

15. 实验完成后，点击核酸纯化仪触控面板主界面上显示的“Maintenance”，选择“UV”，再选择“30min”，然后按“Start”，开启仪器内部的紫外线灯照射 30 min，最后关闭核酸纯化仪电源。

注：仪器运行时间约为 40 min。

【阳性判断值或者参考区间】：无

【检验结果的解释】

结果	意见与建议
终产物有磁珠残留	1、 机器磁座出现问题，需要维护后重新提取 2、 上样量太多，DNA 含量过多导致磁珠凝结，建议减少上样量后重新提取
终产物体积不足	1、 上样量太多，DNA 含量过多导致磁珠凝结而导致枪头堵塞，建议减少上样量后重新提取 2、 机器点位出现问题，需要维护后重新提取
A260/A280 偏低	1、 蛋白酶 K 活性低，请用新的蛋白酶 K 重新提取 2、 建议使用新鲜检体重新提取

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒试剂条中含有固定量的磁珠，其对样品中 DNA 的吸附量是一定的，过多的样品上样量会引起磁珠过饱和而产生结块，从而影响 DNA 提取质量，因此样品上样体积应严格遵守本试剂盒说明书的规定。

【产品性能指标】

1. 试剂盒应包装完好，外观整洁，标识清晰，试剂无漏液现象。

2. 用企业质控品进行核酸提取，所分离基因组 DNA 的质量均可满足下游分子生物学实验需求。

【注意事项】

1. 第一次使用前，请取 1.1mL 蛋白酶 K 缓冲液至蛋白酶 K 管中，混匀至终浓度为 10 mg/mL；

2.长时间不使用时，请将蛋白酶 K 溶液（10 mg/mL）放置于-20 ℃保存；

3. 对于不同的核酸纯化仪机型，本试剂盒的具体操作方法及步骤均有所不同，实验前请完整阅读本说明书及配套核酸纯化仪的说明书。

4. 本试剂盒的核酸提取效果会受到样品来源、样品采集过程、样品质量、样品保存条件及运输条件等多个因素的影响。

5. 不同批号试剂盒的同一成分不可相互混用，严禁使用已超过有效期的试剂盒。

6. 对样品进行预处理时，应尽量使用带滤芯的吸头，以避免样品污染移液器。

7. 如果触碰到样品，请及时更换手套，避免造成交叉污染。

8. 所有的化学药品和生物样品都存在潜在的危险性，操作时，请穿着合适的实验室工作服，并佩戴一次性手套、口罩，做好防护性措施。

9. 使用过的试剂盒与耗材为生化废弃物，应当妥善处理，勿将高浓度漂白水或酸性溶液直接与本试剂盒里的试剂或废弃液接触。

【标识的解释】：无

【参考文献】：无

【基本信息】

备案人/生产企业名称/售后服务单位名称：恺硕生物科技（厦门）有限公司

住所/生产地址：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔星路 96 号建业楼 A 座 501 室/厦门火炬高新区（翔安）产业区建业楼 D 座 301、303 室

邮编：361115 电话：0592-7071056 传真：0592-7071052

生产备案凭证编号：闽厦食药监械生产备 20160003 号

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】

闽厦械备 20150094 号

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2015.08.10

修改日期：2018.05.24