

通用 DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

通用 DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从各种样本中分离纯化病毒、细胞、革兰氏阴性细菌等生物体的基因组 DNA。

【检验原理】

在裂解吸附液和蛋白酶 K 的作用下基因组 DNA 与蛋白质分离，在裂解吸附液高盐低 pH 的环境下，吸附柱内的硅胶膜高效吸附分离的 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附的 DNA，从而达到快速分离纯化基因组 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-D01	消化液	2mL×1 支	4mL×1 瓶	8mL×1 瓶
	裂解吸附液 D	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	RNA 清除剂	500μL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 支
	蛋白酶 K	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 B	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

消化液和 RNA 清除剂：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

蛋白酶 K：常温（10-30℃）运输，-20℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】>使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 提前配制消化缓冲液。
4. 洗脱液的使用量太少会影响提取效果。
5. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
6. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
7. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜的痰液、唾液、宫颈粘液、粘液型或水样粪便、尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、胸腔积液、脑脊液、羊水、各种拭子（宫颈刷）、培养物等。

【适用范围】

≤5.0×10⁶ 个细胞（脱落细胞）；≤2.0×10⁹ 个革兰氏阴性细菌。

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000\times g$ ）、振荡仪、金属浴、1.5mL 离心管、生理盐水和无水乙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- **消化缓冲液配制：**使用前每 1mL 生理盐水中加入 40 μ L 的消化液，配制成消化缓冲液。即用即配。

【样本处理】**1 痰液、唾液、宫颈粘液和粘液型粪便等样本**

1.1 在痰液（宫颈粘液或粘液型粪便）中加入 5 倍体积的消化缓冲液（唾液中加入 3 倍体积的消化缓冲液），室温充分振荡，使粘液完全液化。

1.2 取一定量的液化后的样本加入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟。吸弃上清，保留沉淀。在沉淀中加入 200 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。

2 尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、胸腔积液、脑脊液、羊水、水样粪便等样本

2.1 取一定量新鲜样本加入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 2 分钟。弃上清，保留沉淀。

2.2 在沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

2.3 在沉淀中加入 200 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。

3 细胞和革兰氏阴性细菌样本

3.1 各种拭子（宫颈刷）：将拭子（宫颈刷）在生理盐水中振荡 20 秒。取 1mL 振荡后的生理盐水加入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3.2 贴壁生长细胞：在指数生长期，取适量胰酶消化后的细胞加入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3.3 液体培养细胞（革兰氏阴性细菌）：在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的培养细胞（革兰氏阴性细菌）的悬液（或者已计数的细胞/细菌悬液）， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3.4 细胞保存液保存的细胞：取出细胞保存液保存的细胞，37 $^{\circ}$ C 水浴中摇动至完全融化。取适量细胞转入 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

3.5 固体培养的革兰氏阴性细菌：用接种环刮取一定量的微生物，加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中，充分混匀后， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3.6 在上述沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。在沉淀中加入 200 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。

➤残留的培养基（保存液）能影响 DNA 的纯度和提取效率，对细胞（细菌）进行 1 次洗涤能明显改善 DNA 纯度和提取效率。

【操作步骤】

1A. 高纯度 DNA 提取的操作

- ①在含已处理样本的 1.5mL 离心管中加入 10μL RNA 清除剂，混匀后瞬时离心，42℃静置孵育 5 分钟。
- ②取出 1.5mL 离心管，加入 200μL 裂解吸附液 D 和 20μL 蛋白酶 K，充分混匀，瞬时离心，60℃静置孵育 10 分钟。

1B. 普通纯度 DNA 提取的操作 在含已处理样本的 1.5mL 离心管中加入 200μL 裂解吸附液 D、20μL 蛋白酶 K 和 10μL RNA 清除剂，充分混匀，瞬时离心，60℃静置孵育 10 分钟。

►有些细胞中含有丰富的 RNA，RNA 残留会抑制某些下游酶实验。如果要获得无 RNA 残留的 DNA 提取物可选择“步骤 1A”；如果对 RNA 残留无特殊要求可选择“步骤 1B”。

2. 取出 1.5mL 离心管，开盖，加入 200μL 无水乙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

►150μL 异丙醇代替 200μL 无水乙醇也可以获得较好的提取效率。

3. 闭盖 12,000×g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

►转移液体时，避免液体接触吸附柱的管口。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600μL RAW1，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

►加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

-
6. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 无水乙醇，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

-
7. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000×g 离心 3 分钟，丢弃离心管。

-
8. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 50μL 洗脱液 B 至吸附柱中心。闭盖室温静置 3 分钟，12,000×g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

►洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整，但不得低于 30μL。

【通用 DNA 提取（柱式法）常见问题解答】

常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	样本使用量过多	减少样本使用量，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
未提取到 DNA 或产量低	1. 样本使用量过少	增加样本使用量，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 DNase 导致 DNA 降解。采用新鲜或正确保存的样本。
	3. 样本裂解不充分	蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K。
	4. 乙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入无水乙醇。
	5. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	6. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，乙醇含量达 80%。
	7. 洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65°C 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。
DNA 降解	1. 样本未及时保存或保存不当	采用新鲜或正确保存的样本。
	2. 样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
纯度低	1. 盐离子残留	避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。
	2. 蛋白残留	有些样本蛋白含量较高，容易导致蛋白残留。减少样本使用量；加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；增加 1 次 RAW1 洗涤。
	3. 乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 $12,000 \times \text{g}$ 再离心 3 分钟。
RNA 残留	1. 样本使用量过高	不同样本 RNA 含量相差大，减少样本使用量，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 样本处理时未加入 RNA 清除剂	按说明书正确加入 RNA 清除剂。

【说明书编制日期】 2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564 138 6175 7779