

游离 DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

游离 DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从 1-5mL 人或动物血浆（血清）或体液（包括滑膜液、脑脊液、胸水、腹水和尿液等）中分离纯化出高质量、高浓度的游离 DNA。

【检验原理】

裂解吸附液和蛋白酶 K 使游离 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，硅胶膜释放吸附的游离 DNA，从而达到快速分离纯化游离 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	10T	20T
MDT-CFD01	裂解吸附液 N50	50mL×2 瓶	100mL×2 瓶
	蛋白酶 K	2.5mL×1 瓶	5mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶
	AW2 缓冲液	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	10 支	20 支
	吸附柱延伸管	10 支	20 支
	转接头	10 支	20 支
	洗脱液 B	1.5mL×1 支	3mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份

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 AW2，AW2 中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 提前配制裂解吸附液 A
4. 洗脱液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】

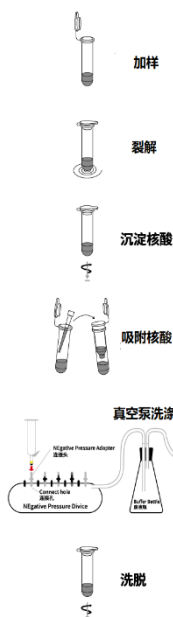
- ①血浆或血清：随机抽取全血，分离血清；用 EDTA 抗凝的全血分离血浆。滑膜液、脑脊液、胸水和腹水等样本根据需要用 EDTA 抗凝。
- ②样本尽快检测，超过 2 小时使用时需要保存于 2-8℃，保存时间不超过 72 小时。长期使用的样本需-80℃或液氮保存，或者使用保存液按要求保存。
- ③溶血和脂血对提取无影响。

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 16,000 \times g$ ）、振荡仪、恒温振荡水浴槽、1.5mL 离心管、无水乙醇和异丙醇等。

- **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。
- **AW2 配制**：AW2 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 80%，混匀后密封常温保存。
- **裂解吸附液 A 配制**：使用前按标本数吸取相应体积的裂解吸附液，每 1mL 裂解吸附液 N50 中加入 25 μ L 蛋白酶 K，配成裂解吸附液 A。

【快速操作流程-真空泵洗涤法】



1. 准备工作
 - ☑检查RAW1是否配制。
 - ☑检查AW2是否配制。
 - ☑检查裂解吸附液A是否配制。
2. 取新鲜EDTA抗凝血，1,900×g离心10分钟，吸取上清。上清16,000×g离心10分钟，再次吸取上清。
3. 在50mL离心管中加入3mL（1mL，2mL，4mL，5mL）制备好的样品和2倍体积的裂解吸附液A，3,000rpm振荡混匀15秒。60℃振荡孵育15分钟。
4. 取出离心管，加入0.9mL（0.3mL，0.6mL，1.2mL，1.5mL）异丙醇，混匀后，冰浴5分钟。
5. 将吸附柱与转接头和吸附柱延伸管装配完成，放入负压装置上。转移液体至吸附柱延伸管中。开启装置，调节负压至0.07MPa，关闭电源。使延伸管中液体完全过柱。继续放置1分钟。
6. 加入750μL RAW1，开启装置，调节负压至0.07MPa，关闭电源。使溶液完全过柱。
7. 加入750μL AW2，开启装置，调节负压至0.07MPa，关闭电源。使溶液完全过柱。
8. 加入750μL无水乙醇后，开启装置，调节负压至0.07MPa，关闭电源。使溶液完全过柱。
9. 重复步骤8一次。
10. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管，闭盖12,000rpm离心3分钟。
11. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入50μL洗脱液B至吸附柱中心位置。闭盖室温静置3分钟，12,000×g离心1分钟，收集洗脱液。

【快速操作流程-离心柱洗涤法】



1. 准备工作
 - ☑检查RAW1是否配制。
 - ☑检查AW2是否配制。
 - ☑检查裂解吸附液A是否配制。
2. 取新鲜EDTA抗凝血，1,900×g离心10分钟，吸取上清。上清16,000×g离心10分钟，再次吸取上清。
3. 在50mL离心管中加入3mL（1mL，2mL，4mL，5mL）制备好的样品和2倍体积的裂解吸附液A，3,000rpm振荡混匀15秒。60℃振荡孵育15分钟。
4. 取出离心管，加入0.9mL（0.3mL，0.6mL，1.2mL，1.5mL）异丙醇，混匀后，冰浴5分钟。
5. 将吸附柱与转接头和吸附柱延伸管装配完成，放入负压装置上。转移液体至吸附柱延伸管中。开启装置，调节负压至0.07MPa，关闭电源。使延伸管中液体完全过柱。继续放置1分钟。
6. 取下吸附柱放入收集管，闭盖12,000×g离心3分钟
7. 加入650μL RAW1，12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。
8. 加入650μL AW2，12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。
9. 加入650μL无水乙醇，12,000×g离心20秒。取出吸附柱，丢弃收集管。
10. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，12,000×g离心3分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。
11. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入50μL洗脱液B至吸附柱中心位置。闭盖室温静置3分钟，12,000×g离心1分钟，收集洗脱液。

【标准操作步骤】

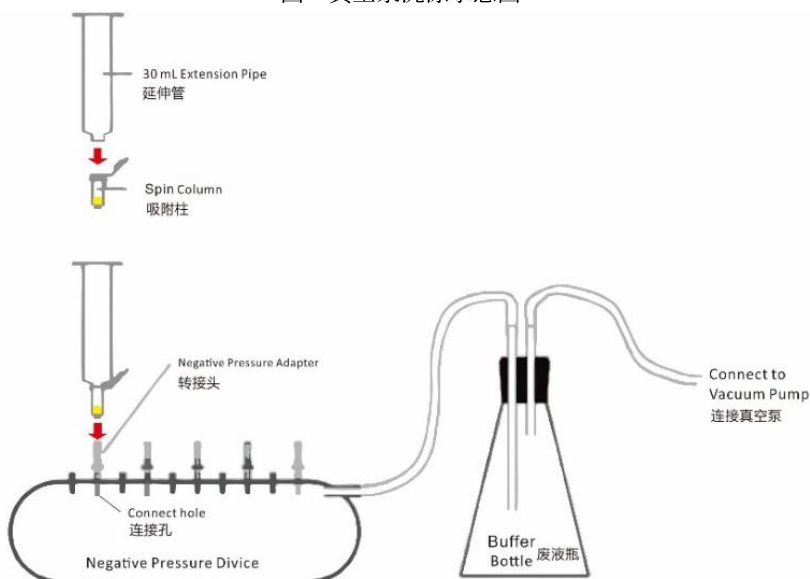
1. **血浆（血清或体液）样本的制备：**取新鲜 EDTA 抗凝血（已析出血清的不抗凝血或体液）， $1,900\times g$ 离心 10 分钟，吸取上清；上清 $16,000\times g$ 离心 10 分钟，再次吸取上清。短期使用， 4°C 保存；长期使用， -70°C 保存。
2. 在 50mL 离心管中加入 3mL（1mL，2mL，4mL，5mL）制备好的样品和 2 倍体积的裂解吸附液 A， $3,000\text{rpm}$ 振荡混匀 15 秒。 60°C 振荡孵育 15 分钟。
3. 取出离心管，加入 0.9mL（0.3mL，0.6mL，1.2mL，1.5mL）异丙醇，混匀后，冰浴 5 分钟。
4. 将吸附柱与转接头和吸附柱延伸管装配完成后，放入负压装置上。转移液体至吸附柱延伸管中。开启负压装置，调节负压至 0.07MPa ，关闭负压电源。使延伸管中液体完全过柱（参见模型图）。液体完全过柱后，继续放置 1 分钟。

以下为真空泵洗涤法：

5. 在吸附柱中加入 $750\mu\text{L}$ RAW1 后，开启负压装置，调节负压至 0.07MPa ，关闭负压电源。使 RAW1 完全过柱。
6. 在吸附柱中加入 $750\mu\text{L}$ AW2 后，开启负压装置，调节负压至 0.07MPa ，关闭负压电源。使 AW2 完全过柱。
7. 在吸附柱中加入 $750\mu\text{L}$ 无水乙醇后，开启负压装置，调节负压至 0.07MPa ，关闭负压电源。使乙醇完全过柱。
8. 重复步骤 7 一次。
9. 取出吸附柱放入收集管，闭盖 $12,000\times g$ 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃收集管。
10. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 $50\mu\text{L}$ 洗脱液 B 至吸附柱中心位置，闭盖室温静置 3 分钟， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

➤洗脱液 B 使用量可以根据需要调整，但不得低于 $30\mu\text{L}$ 。

图 2 真空泵洗涤示意图



以下为离心洗涤法：

5. 取下吸附柱放入收集管，闭盖 12,000×g 离心 3 分钟。
>取下吸附柱时，避免延伸管残留微量液体接触吸附柱的管口。
6. 开盖，在吸附柱中加入 650μL 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。
7. 开盖，在吸附柱中加入 650μL AW2，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。
8. 开盖，在吸附柱中加入 650μL 无水乙醇，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。
9. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000×g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。
10. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 50μL 洗脱液 B 至吸附柱中心位置。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 使用量可以根据需要调整，但用量不得低于 30μL。

【游离 DNA 提取（柱式法）常见问题解答】

提取常见问题	原因	解决方案
未提取到游离 DNA 或产量低	1.全血使用 EDTA 以外的抗凝剂抗凝	其他抗凝剂可能加速血液 DNA 的降解。使用 EDTA 抗凝剂抗凝的血液，对新样品重新纯化。
	2.样本使用量过少	增加样本使用量。
	3. 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 导致游离 DNA 降解。采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本。
	4.样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
	5.样本裂解不充分	蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K。
	6.异丙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入异丙醇。
	7. 洗液 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%。
	8. 含 80%乙醇的 AW2 配制不当	使用无水乙醇配制 80%AW2，乙醇含量达 80%。
	9.洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65℃ 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。
gDNA 污染	1. 抽血过程中白细胞遭到破坏，基因组 DNA 释放到血浆/血清	重新抽血，避免白细胞遭到破坏。
	2. 从抽血到血浆/血清制备之间时间过长，基因组 DNA 释放到血浆/血清	抽血后尽快分离血浆/血清。
	3.血浆/血清制备时离心时间或速度不够，有核细胞未彻底去除	增加离心时间或速度。
纯度低	1.盐离子残留	避免 RAW1 接触吸附柱上下口。
	2.乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000×g 再离心 3 分钟。

【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