通用 DNA 提取试剂盒（磁珠法）使用说明书

【预期用途】

通用 DNA 提取试剂盒（磁珠法）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，磁珠表面的硅胶高效吸附分离的 DNA；洗涤磁珠，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶释放吸附的 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-D02	消化液	2mL×1 瓶	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
	磁珠	500μL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 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

蛋白酶 K：常温（10-30℃）运输，-20℃保存；
消化液、RNA 清除剂和磁珠：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；
其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】<u>使用前务必认真阅读以下注意事项</u>

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. 磁珠使用前必须充分混匀，磁珠不均匀容易导致磁珠吸取量不准确，从而影响提取效率。
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】

新鲜的痰液、脓液、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、组织渗出液、组织浸出液、羊水、各种拭子（宫颈刷）、培养物等。

【适用范围】

≦5.0×10^6 个细胞（脱落细胞）；≦2.0×10^9 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≥12,000×g）、振荡仪、恒温振荡金属浴或金属浴、2mL 磁力架、1.5mL 离心管、生理盐水、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 40μL 的消化液，配制成消化缓冲液。即用即配。

【样本处理】

1 痰液、脓液、唾液、宫颈粘液和粘液型粪便等样本

1.1 在痰液（脓液、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×g 离心 1 分钟。吸弃上清，保留沉淀。在沉淀中加入 200μL 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、组织渗出液、组织浸出液、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×g 离心 2 分钟。吸弃上清，保留沉淀。

2.2 在沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

2.3 在沉淀中加入 200μL 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×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×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×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℃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×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×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3.6 在上述沉淀中加入 500μL 生理盐水，充分悬浮沉淀。12,000×g 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。在沉淀中加入 200μL 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. 取出离心管，开盖，加入 280μL 异丙醇和 10μL 混匀的磁珠，闭盖，室温 3000rpm 振荡 30 秒。

➢磁珠使用前必须充分混匀。

3. 取出离心管，瞬时离心。将离心管放于磁力架上，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

➢吸附磁珠务必至液体清澈。

4. 加入 600μL RAW1，闭盖。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

5. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

➢吸附磁珠务必至液体清澈。

6. 加入 600μL 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，充分混匀使磁珠完全分散至洗液中。

7. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

➢吸附磁珠务必至液体清澈。

8. 加入 600μL 80%乙醇水溶液。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在乙醇水溶液中。转移乙醇水溶液中的磁珠至新的 1.5mL 离心管中。

➢务必将 80%乙醇水溶液中的磁珠转移至新的 1.5mL 离心管中，否则易引起离子残留过多。

9. 将新的离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

➢吸附磁珠务必至液体清澈。

10. 将离心管放入离心机，闭盖瞬时离心 5 秒。

11. 将离心管放回 2mL 磁力架，开盖，吸弃残留液体。

12. 将离心管放入金属浴，开盖，50℃烘干 2 分钟。闭盖，取出离心管。

➢样本较多时，取出离心管后必须闭盖，以防磁珠过度干燥，影响洗脱效果。

13. 开盖，在离心管中加入 50μL 洗脱液 B，充分吹打混匀磁珠。闭盖，室温 1500rpm 振荡 3 分钟。

➢洗脱液 B 的量可以根据需要调整，但不得低于 20μL。

14. 将离心管放入磁力架上，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸取洗脱液转移至新的离心管中。

➢为了避免洗脱液中微量磁珠残留，洗脱液转移至新的离心管后，可以 12,000rpm 离心 1 分钟，以彻底去除磁珠。

【通用 DNA 提取（磁珠法）常见问题解答】

常见问题	原因	解决方案
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.异丙醇醇使用量过少或过多	按说明书准确加入异丙醇。
	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	适当减少洗脱体积，提高洗脱温度至 50°C。
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	第二次加入 80%乙醇洗涤后，磁珠务必移至新的 1.5mL 离心管。
	2.乙醇残留	磁珠未完全干燥，延长干燥时间。

【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（微信同号）；138 6175 7779（微信同号）