

微量游离核酸(DNA/RNA)提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

微量游离核酸(DNA/RNA)提取试剂盒（柱式法）用于从少量人或动物血浆（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、高浓度的游离核酸包括游离 DNA 和游离 RNA。

【检验原理】

裂解吸附液和蛋白酶 K 使游离核酸与蛋白质分离，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核酸；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核酸，从而达到快速分离纯化游离核酸的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-CFN03	裂解吸附液 R	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶
	核酸保护剂	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	2mL×1 支	5mL×1 瓶	10mL×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；

核酸保护剂: 常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他成分: 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. 当储存温度低于 10°C时，裂解吸附液易出现结晶，使用前需温浴使结晶完全溶解。
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】

- 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°C，保存时间不超过 72 小时。长期使用的样本需-20°C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 $\geq 12,000 \times g$ ）、带振荡功能的金属浴、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。
- **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。

【操作步骤】

1. **体液样本的制备**：取新鲜体液， $1,900\times g$ 离心 10 分钟，吸取上清；上清 $16,000\times g$ 离心 10 分钟，吸取上清。短期使用， 4°C 保存；长期使用， -70°C 保存。

2. 在 1.5mL 离心管中加入 150 μL 已制备的样品、10 μL 核酸保护剂、300 μL 裂解吸附液和 20 μL 蛋白酶 K， 60°C （金属浴）1,500rpm 振荡 15 分钟。

▶当储存温度低于 10°C 时，裂解吸附液易出现结晶，使用前需温浴使结晶完全溶解。

3. 取出离心管，瞬时离心。开盖，加入 300 μL 异丙醇，吹打混匀。

4. 将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。闭盖 $12,000\times g$ 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。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL RAW1，闭盖 $12,000\times g$ 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。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL 80%乙醇水溶液，闭盖 $12,000\times g$ 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。

7. 开盖，在吸附柱中加入 600 μL 无水乙醇，闭盖 $12,000\times g$ 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中。

8. 闭盖 $12,000\times g$ 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

9. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 20 μL 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 的使用量可以根据需要调整。

【微量游离核酸提取（柱式法）常见问题解答】

常见问题	原因	解决方案
核酸产量低	1.全血使用 EDTA 以外的抗凝剂抗凝	其他抗凝剂可能加速病毒核酸的降解。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.样本保存不当	内源性核酸酶导致游离病毒核酸降解。样本保存温度不当或保存时间过长。采用新鲜、适当保存的样本。
	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.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%。
	7.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%。
	8.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。
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 离心 3 分钟。

【说明书编制日期】 2024 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）