

核酸提取或纯化试剂使用说明书

【产品名称】

通用名称：游离 DNA 提取试剂盒（磁珠法）

英文名称：Surbiopure Cell Free DNA Extraction Kit

【包装规格】 24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/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。

【实验原理】本试剂盒采用具有分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，在特定的盐离子浓度和 pH 值条件下，磁珠特异的吸附小片段的游离 DNA，蛋白质和其他脂类等杂质不能结合硅胶膜，通过洗液 1 与 80% 的乙醇多次漂洗，得到较纯的 DNA 产物，其产物可广泛适用于产前无创诊断和癌症基因分析诊断。

【主要组成成分】

组成	24 人份	48 人份	96 人份	储存条件
裂解液 CFL	60 mL	120 mL	250mL	室温储存
蛋白酶 K(20mg/mL)	550 μ L	1.1 mL	1.1 mL \times 2	-20 $^{\circ}$ C 储存
20%SDS	10 mL	10 mL	10 mL	室温储存
洗液 1	33 mL	66 mL	132 mL	室温储存
洗脱液	5 mL	5 mL	10 mL	室温储存
磁珠（50mg/ml）	1.25 mL	2.5 mL	5 mL	室温储存

注：本试剂提供的试剂只满足处理 1ml 血浆方案的用量。

另需要准备的试剂及注意事项：

- 无水乙醇（分析纯）、超纯水或去离子水。
- 1.5mL、15ml、50ml 磁力架和配套的离心管及枪头耗材。
- 磁珠初次使用时，必须剧烈摇晃 1-2min，让磁珠充分分散。

【储存条件及有效期】 试剂盒储存在常温，有效期 12 个月。

【适用仪器】 Kingfisher DUO\Kingfisher FLEX、AS-20B、50ml 磁力架等大体积同类仪器。

【样品要求】

- 1 用装有 EDTA 抗凝剂的采血管取病人或孕妇（孕 12-24 周）5 mL 全血，上下颠倒混匀，4℃运输。
- 2 在离心机中 3000 rpm 的转速下，离心 10min 分离血浆。按 1mL/支收集血血浆，直接进入下一步实验或-20℃储存。

【实验准备】

使用前用无水乙醇稀释洗液 1，做好标记√。

规格	加入乙醇的量
<input type="checkbox"/> 24 人份	加入 20 mL 无水乙醇，混匀
<input type="checkbox"/> 48 人份	加入 40mL 无水乙醇，混匀
<input type="checkbox"/> 96 人份	加入 80mL 无水乙醇，混匀

现用现配 80%乙醇：取 20mL 超纯水，加入 80mL 的无水乙醇，上下颠倒混匀。

【实验步骤】

手动磁力架使用方案：

1. 血清/血浆样本预处理

取 1mL 血清/血浆 12000rpm 离心 10 min，收集上清，用于游离核酸的提取。

注意:也可将血清/血浆样本在 6000×g 下离心 30min 以去除剩余的血细胞和细胞碎片。

2. 蛋白酶 K 处理

根据提取样本的体积，按照下表指示，添加试剂到 15mL 离心管：

试剂	体积			
血浆/血清体积	1 mL▶	2 mL▼	4 mL◀	5 ml▲
蛋白酶 K(20mg/mL)	20 μL	40 μL	80 μL	100 μL
20%SDS	50 μL	100 μL	200 μL	250 μL
total	1.07 mL	2.14 mL	4.28 mL	5.35ml

注意：不要将 SDS 直接加到蛋白酶 K 中，以避免蛋白酶 K 失去活性。

3. 混匀后在恒温混匀仪或水浴锅中 65 °C 孵育 30 min，其中每间隔 10min 摇匀一次，使样品充分裂解；

4. 孵育完毕后，将离心管放在冰上 2 min，冷却到室温(此步骤是让溶液平衡至室温更有利于游离 DNA 的结合，不可忽略)。

5. 在步骤 4 离心管中加入 (▶1.5 mL、▼3 mL、◀6mL、▲9 mL) 裂解液 CFL 和 (▶50 μ L、▼100 μ L、◀200 μ L、▲300 μ L) 磁珠 (50mg/ml) 涡旋混匀，放置旋转混匀仪上，缓慢旋转摇匀 10 min，将离心管放置在磁力架上，磁吸 3min，待磁珠完全吸附时小心移弃液体；

(计算液体的总体积，当体积大于 15mL 时，请使用 50mL 的离心管或者分多个 15mL 的离心管富集核酸)

6. 将离心管小心从磁力架上取下，加入 800 μ L 洗液 1 (使用前请检查是否已加入指定量的无水乙醇)，涡旋混匀后转移至 2ml 离心管中(全部转移混合物)，放置 1.5mL 磁力架上磁吸 60sec，待磁珠完全吸附时小心吸弃液体；

7. 重复一次步骤 6；

8. 将离心管小心从磁力架上取下，加入 800 μ L 80%乙醇，涡旋混匀，放置磁力架上磁吸 60 sec，待磁珠完全吸附时小心吸弃液体；

9. 使用 800 μ L 80%乙醇重复一次步骤 8；

(移去液体时应尽可能吸尽液体，避免残留的乙醇影响核酸提取效果)

10. 离心管放置磁力架上，室温晾干 5 min。

11. 将离心管从磁力架上取下，加入 50 μ L~150 μ L 洗脱液，涡旋混匀，65 $^{\circ}$ C 孵育 5min。

12. 将离心管放置于磁力架上 2min，待磁珠完全吸附时小心转移核酸溶液至新的离心管中，并保存-20 $^{\circ}$ C或进入下一步实验。

全自动核酸提取仪方案

(①以赛默飞世尔 KingFisher Flex 大体积模块提取 1mL 血浆样本为例)

1、按照如下表将准备好的试剂分装到 24 孔板中。

试剂板名称	板位	试剂成分	试剂体积
样品板	1	裂解液CFL/磁珠	1.5mL/50μL
洗液1板	2	洗液1	1mL
洗液2板	3	80%乙醇	1mL
洗液3板	4	80%乙醇	1mL
洗脱板	5	洗脱液	50-100μL

2、样本处理按照手动方案处理，将处理好的全部血浆（1.07ml）全部转移到样品板中，打开核酸自动提取仪，按照程序提示将样品板、洗液 1 板、洗液 2 板、洗液 3 板、洗脱板依次放入核酸提取仪的卡位上。

3、运行 SUP_Cell Free DNA01 提取程序，约 25min，提取完毕，将核酸转移至低吸附的离心管中，短时间存放至-20℃，或者立即进入下一步实验。

(②以奥盛 AP-20B 大体积模块提取 1ml 血浆样本为例)

1、按照如下图将试剂分装到 7 孔试剂条中。



2、按照如下表，设计仪器运行程序,命名 SUP_Cell Free DNA01

程序步骤	孔位	名称	混合时间 (sec)	吸磁时间 (sec)	等待时间 (sec)	容积 (μL)	混合速度	温度状态
1	1	裂解吸附	600	120	0	2570	9	off
2	2	洗涤 1	120	60	0	1000	9	off
3	3	洗涤 2	60	60	0	1000	9	off
4	4	洗涤 3	60	60	0	1000	9	off
5	6	乙醇挥发	0	0	2	600	9	off
6	7	洗脱	300	60	0	50	6	65℃
7	2	弃磁珠	30	0	0	1000	9	off

3、样本处理按照手动方案处理，将处理好的全部血浆（1.07ml）全部转移到样品板中，打开核酸自动提取仪，按照程序提示将样品板、洗液 1 板、洗液 2 板、洗液 3 板、洗脱板依次放入核酸提取仪的卡位上。

4、运行 SUP_Cell Free DNA01 提取程序，约 25min，提取完毕，将核酸转移至低吸附的离心管中，短时间存放至-20℃，或者立即进入下一步实验

【检验方法的局限性】

推荐使用 Agilent Bioanalyzer 2100 对提取得到的核酸进行检测，若使用 Thermo fisher Nano-Drop 测量，结果仅供参考，不作为评估提取核酸质量的结果。

【检验结果的判定】

使用仪器 Agilent Bioanalyzer 2100 检测结果中，100 bp ~ 500 bp 之间最少有一个峰值，最高峰为 167bp。

【注意事项】

1. 蛋白酶 K 处理样本时，先加蛋白酶 K，再加样本，最后加 20%SDS，不要将 SDS 直接与蛋白酶 K 混合，以免蛋白酶 K 失去活性。
2. 裂解液 CFL 的用量要根据血清、血浆的体积等倍数的增加，例如：当血清、血浆的体积为 2 mL 时，需要加入裂解液 CFL 的体积为 3 mL；当血清血清、血浆的体积为 4 mL 时，加入裂解液 CFL 的体积为 6 mL。
3. 漂洗液中含有易挥发成份，保存时确保瓶盖旋紧。
4. 完成提取后，10 min 内转移 DNA 至 Low Binding Tube 管（sigma，Z666505）中，避免游离核酸长时间暴露在空气中而降解。
5. 实验开始前后，请清洁工作台，并进行消毒。
6. 试剂使用前应在常温下混匀。

【参考文献】

严子禾等.4 种血浆游离 DNA 提取方法的比较. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science .2006, Vol.24, No.5.

Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K. et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 190-196.

Lun F M, Chiu R W, Allen Chan K C, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem,008,4(10): 1664-1672.

Kyong-Ah Yoon, Sohee Park, et al. Comparison of Circulating Plasma DNA levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls[J]. Journal of Molecular Diagnostics ,2009, Vol,11, NO.3, 182-185.

【基本信息】

企业名称：广州赛百纯生物科技有限公司

住所：广州市黄埔区瑞发路 12 号自编三栋第四层自编 01 单元

邮政编码：510700

电话号码：020-22303768

传真号码：020-22303768

电子邮箱：sbctek@163.com

公司网址：www.surbiopure.com

售后服务单位名称：广州赛百纯生物科技有限公司

服务热线：18926136067

传真号码：020-22303768

电子邮箱：sbctek@163.com

【生产备案凭证编号】