



核酸提取或纯化试剂 说明书

【产品名称】 核酸提取或纯化试剂

【包装规格】 型号一：96次/盒；型号二：96次/盒；型号三：96次/盒

【预期用途】

用于核酸的提取、富集、纯化步骤，其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒采用无毒的脱蜡剂去除石蜡，降低实验过程中对实验者的危害。组织裂解后，DNA结合于硅基包被磁珠表面。漂洗后，高纯度的DNA洗脱于洗脱缓冲液或去离子水中。经过纯化的DNA可以直接用于PCR、荧光定量PCR、SNP基因分型、STR基因分型、二代测序和药物基因组学研究等。DNA的得率、片段大小与样品类型、储存条件及储存时间有很大关系。

【主要组成成分】

型号一：

试剂名称	96 次/盒	
	规格	数量
脱蜡剂	30 mL/ 瓶	1 瓶
裂解缓冲液 1	30 mL/ 瓶	1 瓶
裂解缓冲液 2	30 mL/ 瓶	1 瓶
漂洗缓冲液 1（浓缩液）	80 mL/ 瓶	1 瓶
漂洗缓冲液 2（浓缩液）	50 mL/ 瓶	1 瓶
洗脱缓冲液	30 mL/ 瓶	1 瓶
蛋白酶 K	25 mg /支	4 支
蛋白酶 K 保存液	1.25 mL/ 支	4 支
RNA 酶A	0.3 mL/ 支	1 支
磁珠悬浮液	1 mL/ 支	2 支

型号二：

名称	规格	列	试剂名称
96 孔预装板	16 次/板 ×6 板	1、7	裂解缓冲液 2
		2、8	漂洗缓冲液 1
		3、9	漂洗缓冲液 1
		4、10	漂洗缓冲液 2, 磁珠悬浮液
		5、11	漂洗缓冲液 2
		6、12	洗脱缓冲液
8 联深孔磁套	2 条/包×6包		
蛋白酶 K	25 mg/支×4支		
蛋白酶 K 保存液	1.25 mL/支×4支		
裂解缓冲液 1	30 mL/瓶×1瓶		
脱蜡剂	50 mL/瓶×1瓶		
RNA 酶A	0.3 mL/支×1支		

型号三：

试剂名称	96 次/盒	
	规格	数量
样本板	1块	1
漂洗板1	1块	1
漂洗板2	1块	1
漂洗板3	1块	1
漂洗板4	1块	1
洗脱板	1块	1
磁套板	1块	1
蛋白酶K	25 mg/支	4支
蛋白酶 K 保存液	1.25 mL/支	4支
脱蜡剂	50 mL/瓶	1
裂解缓冲液 1	30 mL/瓶	1
RNA 酶A	0.3 mL/支	1支

【保存条件及有效期】

4-30℃保存，有效期12个月。
可在4-37℃运输，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1. 适用样本类型：福尔马林固定、石蜡包埋组织。
2. 样本处理与保存：常温处理保存。
3. 样本运输：常温运输。

【检验方法】

自备仪器、试剂

1. 手动单管提取：
 - 1) 恒温混匀仪——货号：CW2593
 - 2) 2/15 mL磁力架——货号：CW2594
 - 3) 异丙醇、无水乙醇
2. 与康为CWE2100全自动核酸提取仪的匹配：
 - 1) 康为CWE2100全自动核酸提取仪
 - 2) 异丙醇、无水乙醇
 - 3) 96孔深孔板——货号：CW2523、8联深孔磁套——货号：CW2524
3. 与康为CWE9600全自动核酸提取仪的匹配：
 - 1) 康为CWE9600全自动核酸提取仪
 - 2) 异丙醇、无水乙醇
 - 3) 96孔深孔板——货号：CW2523、96深孔板磁套——货号：CW2532

实验前准备

向25 mg蛋白酶K中加入1.25 mL蛋白酶K保存液使其溶解，-20℃保存。配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。

操作步骤

型号一：

1. 样本处理
 - 1.1 石蜡包埋样本
 - 1.1.1 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm的薄片。
 - 1.1.2 取约1×1 cm²的切片（共约3-8片切片）置于离心管（自备）中，加入160 μL 脱蜡剂，涡旋震荡10秒。再加入180 μL裂解缓冲液1和20 μL蛋白酶K，涡旋震荡10 秒。12000 rpm，25℃离心1分钟。

注意：1) 如果样品表面已经暴露在空气中，请将接触空气的2-3片弃掉不用。

2) 如样品量多可增加脱蜡剂量至500 μL。

3) 脱蜡剂低于18℃会凝固，如果凝固不影响下面的实验。
 - 1.1.3 56℃孵育1小时，直至样品完全溶解，90℃孵育1小时。12,000rpm，25℃离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层的水相（约180 μL）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56℃孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90℃后再把样品置于90℃孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG（1U/μL），50℃，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T|G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S

1.1.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA 酶 A 溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.1.5 加入20 μL 蛋白酶 K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

1.2 福尔马林等固定液中的样本

1.2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500 μL 10mM PBS (PH 7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心1分钟，弃上清，重复3次。

1.2.2 向上述离心管中加入180 μL 裂解缓冲液1，20 μL 蛋白酶K溶液，涡旋震荡混匀。

1.2.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。12,000rpm离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约180 μL ）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56°C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/ μL)，50°C，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T/G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.2.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA 酶 A 溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.2.5 加入20 μL 蛋白酶 K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

2. 手动单管操作

2.1 向离心管中加入200 μL 裂解缓冲液2并涡旋震荡混匀。

2.2 向离心管中加入300 μL 异丙醇与20 μL 磁珠悬浮液后涡旋震荡混匀5秒钟，之后将离心管固定于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合10分钟。

2.3 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。

2.4 向离心管中加入750 μL 漂洗缓冲液1（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡5秒钟后置于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。

2.5 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。

2.6 重复步骤2.4-2.5。

2.7 向离心管中加入750 μL 漂洗缓冲液2（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡5秒钟后置于25°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。

2.8 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。

2.9 重复步骤2.7-2.8。

2.10 离心管短暂离心后，将其重新固定于磁力架上用移液器去除管底溶液，之后开盖室温放置5-10分钟使乙醇充分挥发。

2.11 向离心管中加入50-200 μL 洗脱缓冲液后涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱液中，之后将离心管固定于56°C、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟。

2.12 将离心管固定于磁力架上静置2分钟，之后将洗脱液转移至新的离心管中-20°C保存备用。

3. 与CWE2100的匹配

产品与CWE2100匹配后可一次性从1-32份固定组织样本中提取基因组DNA。

3.1 按下表将样品与试剂加入到96孔深孔板的相应位置中：

位置	试剂及用量
1 & 7 列	裂解产物: 全部 裂解缓冲液2: 200 μ L 磁珠悬浮液: 20 μ L 异丙醇: 300 μ L
2 & 8列	漂洗缓冲液1: 750 μ L
3 & 9列	漂洗缓冲液1: 750 μ L
4 & 10列	漂洗缓冲液2: 750 μ L
5 & 11列	漂洗缓冲液2: 750 μ L
6 & 12列	洗脱缓冲液: 70 μ L

3.2 将8联深孔磁套与96孔深孔板放入CWE2100中，运行CWY039_CWE2100。

3.3 约30分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和8联深孔磁套从仪器中取出，把6&12列中的洗脱产物转移至离心管中-20℃保存备用。

4. 与CWE9600的匹配

产品与CWE9600匹配后可一次性从1-96份固定组织样本中提取基因组DNA。

4.1 按下表将样品与试剂加入到相应96孔深孔板中：

位置	试剂及用量
样本板	裂解产物: 全部 裂解缓冲液2: 200 μ L 磁珠悬浮液: 20 μ L 异丙醇: 300 μ L
漂洗板1	漂洗缓冲液1: 750 μ L
漂洗板2	漂洗缓冲液1: 750 μ L
漂洗板3	漂洗缓冲液2: 750 μ L
漂洗板4	漂洗缓冲液2: 750 μ L
洗脱板	洗脱缓冲液: 70 μ L

4.2 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE9600中，运行CWY039_CWE9600程序。

4.3 约30分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，把洗脱板中的洗脱产物转移至离心管中-20℃保存备用。

型号二：

产品与全自动核酸提取仪CWE2100匹配可一次性从1-32份固定组织样本中提取基因组DNA。

1. 样本处理

1.1 石蜡包埋样本

1.1.1 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μ m的薄片。

1.1.2 取约1 $\times$ 1 cm²的切片（共约3-8片切片）置于离心管（自备）中，加入300 μ L 脱蜡剂，涡旋震荡10秒。再加入200 μ L裂解缓冲液1和20 μ L蛋白酶K，涡旋震荡10 秒。12000 rpm，25℃离心1分钟。

注意：1) 如果样品表面已经暴露在空气中，请将接触空气的2-3片弃掉不用。

2) 如样品量多可增加脱蜡剂量至500 μL 。

3) 脱蜡剂低于18°C会凝固，如果凝固不影响下面的实验。

1.1.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解，90°C孵育1小时。12,000 rpm，25°C离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层的水相（约200 μL ）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56°C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/ μL)，50°C，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T/G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.1.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.1.5 加入20 μL 蛋白酶K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

1.2 福尔马林等固定液中的样本

1.2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500 μL 10mM PBS (PH 7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm (~13,400 $\times g$) 离心1分钟，弃上清，重复3次。

1.2.2 向上述离心管中加入200 μL 裂解缓冲液1，20 μL 蛋白酶K溶液，涡旋震荡混匀。

1.2.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。12,000 rpm离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约200 μL ）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56°C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/ μL)，50°C，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T/G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.2.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.2.5 加入20 μL 蛋白酶K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

2. 向深孔板的1&7列加入1中裂解产物后，加入300 μL 异丙醇。

3. 将8联深孔磁套与96孔深孔板放入CWE2100中，运行CWY039_CWE2100。

4. 约30分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和8联深孔磁套从仪器中取出，把6&12列中的洗脱产物转移至1.5 mL离心管中-20°C保存备用。

型号三：

产品与全自动核酸提取仪CWE2100匹配可一次性从1-32份固定组织样本中提取基因组DNA。

1. 样本处理

1.1 石蜡包埋样本

1.1.1 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm 的薄片。

1.1.2 取约1 $\times$ 1 cm^2 的切片（共约3-8片切片）置于离心管（自备）中，加入300 μL 脱蜡剂，涡旋震荡10秒。再加入200 μL 裂解缓冲液1和20 μL 蛋白酶K，涡旋震荡10秒。12000 rpm，25°C离心1分钟。

注意：1) 如果样品表面已经暴露在空气中，请将接触空气的2-3片弃掉不用。

2) 如样品量多可增加脱蜡剂量至500 μL 。

3) 脱蜡剂低于18°C会凝固，如果凝固不影响下面的实验。

1.1.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解，90°C孵育1小时。12,000 rpm，25°C离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层的水相（约200 μL ）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56°C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/ μL)，50°C，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T/G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.1.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.1.5 加入20 μL 蛋白酶K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

1.2 福尔马林等固定液中的样本

1.2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500 μL 10mM PBS (PH 7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm（~13,400 $\times$ g）离心1分钟，弃上清，重复3次。

1.2.2 向上述离心管中加入200 μL 裂解缓冲液1，20 μL 蛋白酶K溶液，涡旋震荡混匀。

1.2.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。12,000 rpm离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约200 μL ）于新离心管中，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意：1) 56°C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/ μL)，50°C，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T/G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.2.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.2.5 加入20 μL 蛋白酶K，65°C，450 rpm孵育15 min后得到裂解产物。

2. 在预装好试剂的样本板孔中加入1中裂解产物后，加入300 μL 异丙醇。

3. 按下表将预装板放入CWE960相应位置上。

预装板名称	CWE960位置
样本板	1
漂洗板1	2
漂洗板2	3
漂洗板3	4
漂洗板4	5
洗脱板	6
磁套板	4

4. 将96深孔板磁套与96孔深孔板放入CWE960中，运行CWY039_CWE9600程序。

5. 约30分钟后程序运行结束，将96孔深孔板和96深孔板磁套从仪器中取出，把洗脱板中的洗脱产物转移至离心管中-20°C保存备用。

【注意事项】

1. 在实验前，应仔细阅读本说明书。
2. 获得样品后，要尽快将样品在4%-10%的福尔马林中固定，固定时间以14-24小时为宜，时间过长易导致基因组断裂，影响下游实验。如果甲醛固定时间过长或样本存放时间过久(> 1年)则易导致DNA完整性受损，无法扩出长片段。
3. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制蛋白酶K的作用。
4. 配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
5. 磁珠悬浮液严禁冰冻、离心。冰冻、离心可能会对磁珠造成不可逆的损害。磁珠悬浮液使用前需涡旋震荡20秒使其充分混匀。
6. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在漂洗缓冲液1（浓缩液）和漂洗缓冲液2（浓缩液）中加入无水乙醇并做好标记。
7. 使用前请检查裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂于56℃水浴重新溶解。
8. 如果下游实验对RNA污染比较敏感，可以在加入裂解缓冲液2前加入2 μ L无DNA酶的RNA酶A（100 mg/mL），试剂盒中的RNA酶A如长时间不用，建议-20℃保存。
9. 实验过程中，磁珠在溶液中的充分混匀对于提取的得率与纯度都有很大的影响。实验过程中务必使磁珠与溶液充分混匀。不同厂家的恒温混匀仪震荡混匀效果有一定差异，实验过程中请注意观察磁珠状态。如出现磁珠贴壁等未充分混匀的现象，请用移液器吹吸混匀或调整震荡频率。
10. 检验方法中涉及到的CWY039_CWE2100和CWY039_CWE960程序由康为世纪另行提供。