

核酸提取或纯化试剂说明书

【产品名称】

通用名称：核酸提取或纯化试剂

商品名称：尿液 DNA 快速提取试剂盒

【包装规格】 50 次/盒

【预期用途】

用于核酸的提取、富集、纯化。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒适用于从≤40ml 尿液中快速提取总 DNA 和（或）cfDNA。收集后的尿液样本，通过添加独特的尿液稳定剂，可使尿液中的细胞和 cfDNA 在室温下稳定长达 1 个月不降解。提取尿液 DNA 时，只需添加纯化珠涡旋后离心收集沉淀物。通过酶消化和化学裂解处理之后，裂解液中的 DNA 高效结合到硅基质吸附柱上，通过洗涤和洗脱步骤之后，可得到高纯度的 DNA 产物。纯化后的 DNA 可以直接用于下游各种分子生物学实验。

【主要组成成分】

组成成分名称	规格	数量
尿液稳定剂	140ml	1
蛋白酶 K 溶液（20mg/ml）	1ml	1
纯化珠	1ml	1
尿液细胞消化缓冲液	20ml	1
基因组 DNA 裂解液	50ml	1
尿液 DNA 洗涤液 1	10ml	1
尿液 DNA 洗涤液 2	12ml	1
DNA 洗脱液	4ml	1
1 号 S 纯化柱	50 个	1
收集管	100 个	1

【储存条件及有效期】

储存条件：蛋白酶 K 溶液-20℃保存；其余组分 4-35℃条件下保存。

有效期：本试剂盒有效期为 12 个月，请在有效期内使用。

【生产日期及失效日期】

见包装标签

【样本要求】

- 1 样本类型：新鲜或冷冻的尿液样本。
- 2 样本量：最多 40ml 尿液。根据实验需求，样本体积可按比例放大。
- 3 样本保存：新鲜样本应尽快处理或置于-20℃/-70℃冻存，避免反复冻融。
- 4 样本运输：收集后的尿液样本低温密封运输；

添加了尿液稳定剂的样本可以常温运输。

【检验方法】

实验前准备：

- ① 添加 β -巯基乙醇到基因组 DNA 裂解液中，终浓度为 0.5%（选做）。

例：50ml 基因组 DNA 裂解液添加 250 μ l

- ② 添加 48 ml 100%乙醇到 12ml 的尿液 DNA 洗涤液 2 中。

加入后请及时在方框打钩标记，以免多次加入。

1. 总 DNA 提取操作步骤

以下步骤用于从 \leq 40ml 的尿液样本中提取 DNA。分三个步骤：

- (A) 总 DNA(细胞内和游离)沉淀；
- (B) 蛋白消化；
- (C) DNA 纯化。

(A) 总 DNA(细胞内和游离)沉淀

1.1 将 40ml 尿液转移至 50ml 离心管中。

注意：如果处理 \leq 1ml 尿液，请使用 1.5ml 离心管。

如果处理 $>1\text{ml}\leq 14\text{ml}$ 尿液，请使用 15ml 离心管。

如果处理 $>14\text{ml}\leq 40$ 尿液，请使用 50ml 离心管。

1.2 每 1ml 尿液添加 70 μ l 尿液稳定剂。（例如，将 350 μ l 尿液稳定剂添加到 5ml 尿液中），涡旋混匀。

添加了稳定剂的尿液可以在室温下最长保存 1 个月，需要提取核酸时，将添加了稳定剂的尿液涡旋振荡混匀。

1.3 如果处理 ≤ 14 ml 尿液，则添加 10 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）；

如果处理 > 14 ml ≤ 40 ml 尿液，则添加 20 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），涡旋充分混合尿液混合物。

1.4 在 3,000 \times g 下离心 15 分钟。

(B) 蛋白消化

1.5 缓慢倒出或吸出全部尿液上清，向细胞沉淀中添加 100–400 μ l 无 DNase/RNase 水。

推荐：如果处理 15–40 ml 尿液，则至少向细胞沉淀中添加 200 μ l 无 DNase/RNase 水。

1.6 向细胞沉淀中加入等体积的尿液细胞消化缓冲液（例如，在 200 μ l 沉淀中加入 200 μ l 尿液细胞消化缓冲液）。通过移液或涡旋重悬沉淀。

1.7 将 5% 的蛋白酶 K 溶液添加到重悬的细胞沉淀中（例如，将 20 μ l 蛋白酶 K 溶液添加到 400 μ l 混合物中），涡旋充分混合，在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。

(C) DNA 纯化

1.8 添加 1 倍体积的基因组 DNA 裂解液至消化后的混合物中。（例如，添加 420 μ l 的基因组 DNA 裂解液至 420 μ l 消化后的混合物中）。

1.9 将 1 号 S 纯化柱套在收集管中，将全部样品转移到 1 号 S 纯化柱中。 $\geq 16,000 \times$ g 离心 1 分钟，弃滤液。

注意：纯化柱最大容积为 800 μ l，如果样品体积超过 800 μ l 需要分多次离心。

1.10 将 1 号 S 纯化柱转移至新的收集管中。

1.11 向柱中添加 200 μ l 尿液 DNA 洗涤液 1， $\geq 16,000 \times$ g 离心 1 分钟，弃滤液。

1.12 向柱中添加 700 μ l 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000 \times$ g 离心 1 分钟，弃滤液。

1.13 向柱中添加 200 μ l 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000 \times$ g 离心 2 分钟，弃滤液。

1.14 将 1 号 S 纯化柱转移至干净的 1.5 ml 离心管（自备）中，将 $\geq 10 \mu$ l 的 DNA 洗脱液（65–70 $^{\circ}$ C 预热）直接添加到柱基质上。室温下放置 3–5 分钟， $\geq 16,000 \times$ g 离心 1 分钟洗脱 DNA。–20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

2. 细胞内 DNA 提取操作步骤

(A) 收集尿液细胞沉淀

2.1 将 40ml 尿液转移至 50ml 离心管中， $3,000 \times g$ 离心 15 分钟。

(B) 蛋白消化

2.2 缓慢倒出或吸出全部尿液上清，向细胞沉淀中添加 100–400ul 无 DNase/RNase 水。

推荐：如果处理 15–40ml 尿液，则至少向细胞沉淀中添加 200ul 无 DNase/RNase 水。

2.3 向细胞沉淀中加入等体积的尿液细胞消化缓冲液（例如，在 200ul 沉淀中加入 200ul 尿液细胞消化缓冲液）。通过移液或涡旋重悬沉淀。

2.4 将 5%的蛋白酶 K 溶液添加到重悬的细胞沉淀中（例如，将 20ul 蛋白酶 K 溶液添加到 400ul 混合物中），涡旋充分混合，在 55℃下孵育 30 分钟。

(C) DNA 纯化

2.5 添加 1 倍体积的基因组 DNA 裂解液至消化后的混合物中。（例如，添加 420μl 的基因组 DNA 裂解液至 420μl 消化后的混合物中）。

2.6 将 1 号 S 纯化柱套在收集管中，将全部样品转移到 1 号 S 纯化柱中。 $\geq 16,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃滤液。

注意：纯化柱最大容积为 800ul，如果样品体积超过 800μl 需要分多次离心。

2.7 将 1 号 S 纯化柱转移至新的收集管中。

2.8 向柱中添加 200ul 尿液 DNA 洗涤液 1， $\geq 16,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃滤液。

2.9 向柱中添加 700ul 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃滤液。

2.10 向柱中添加 200ul 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000 \times g$ 离心 2 分钟，弃滤液。

2.11 将 1 号 S 纯化柱转移至干净的 1.5ml 离心管（自备）中，将 ≥ 10 ul 的 DNA 洗脱液（65–70℃ 预热）直接添加到柱基质上。室温下放置 3–5 分钟， $\geq 16,000 \times g$ 离心 1 分钟洗脱 DNA。–20℃ 保存 DNA。

3. 游离 DNA 提取操作步骤

(A) 尿液细胞分离

3.1 将 40ml 尿液转移至 50ml 离心管中， $3,000 \times g$ 离心 15 分钟。

- 3.2 在不触碰到细胞沉淀情况下，缓慢将尿液上清转移到一个新的 50ml 离心管中。
- 3.3 每 1ml 尿液添加 70ul 尿液稳定剂。（例如，5ml 尿液中加入 350ul 尿液稳定剂），涡旋混匀。

添加了稳定剂的尿液可以在室温下最长保存 1 个月，需要提取核酸时，将添加了稳定剂的尿液涡旋振荡混匀。

- 3.4 如果处理 ≤ 14 ml 尿液，则添加 10ul 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）；

如果处理 > 14 ml ≤ 40 ml 尿液，则添加 20ul 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），涡旋充分混合尿液混合物。

- 3.5 在 3,000 x g 下离心 15 分钟。

(B) 蛋白消化

- 3.6 缓慢倒出或吸出全部尿液上清，向沉淀中添加 100-400ul 无 DNase/RNase 水。

推荐：如果处理 15-40ml 尿液，则至少向沉淀中添加 200ul 无 DNase/RNase 水。

- 3.7 向沉淀中加入等体积的尿液细胞消化缓冲液（例如，在 200ul 沉淀中加入 200ul 尿液细胞消化缓冲液）。通过移液或涡旋重悬沉淀。

- 3.8 将 5% 的蛋白酶 K 溶液添加到重悬的沉淀中（例如，将 20ul 蛋白酶 K 溶液添加到 400ul 混合物中），涡旋充分混合，在 55°C 下孵育 30 分钟。

(C) 游离 DNA 纯化

- 3.9 添加 1 倍体积的基因组 DNA 裂解液至消化后的混合物中。（例如，添加 420ul 的基因组 DNA 裂解液至 420ul 消化后的混合物中）。

- 3.10 将 1 号 S 纯化柱套在收集管中，将全部样品转移到 1 号 S 纯化柱中。 $\geq 16,000$ x g 离心 1 分钟，弃滤液。

注意：纯化柱最大容积为 800ul，如果样品体积超过 800ul 需要分多次离心。

- 3.11 将 1 号 S 纯化柱转移至新的收集管中。

- 3.12 向柱中添加 200ul 尿液 DNA 洗涤液 1， $\geq 16,000$ x g 离心 1 分钟，弃滤液。

- 3.13 向柱中添加 700ul 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000$ x g 离心 1 分钟，弃滤液。

- 3.14 向柱中添加 200ul 尿液 DNA 洗涤液 2， $\geq 16,000$ x g 离心 1 分钟，弃滤液。

- 3.15 将 1 号 S 纯化柱转移至干净的 1.5ml 离心管（自备）中，将 ≥ 10 ul 的 DNA 洗脱液（65-70°C 预热）直接添加到柱基质上。室温下放置 3-5 分钟， $\geq 16,000$ x g 离心 1 分钟洗脱 DNA。-70°C

保存 DNA。

【提取方法的局限性】

样本提取结果与样本收集、处理、及保存质量有关，任何失误都将会导致结果不准确。

【注意事项】

1. 在实验前，应仔细阅读说明书。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致样本中的 DNA 降解从而减少 DNA 提取量。
3. 第一次使用前应按照使用说明在尿液 DNA 洗涤液 2 中加入无水乙醇，并做标记。
4. 蛋白酶 K 溶液勿长时间室温放置，以免影响其活性。
5. 开始提取样本前，将 DNA 洗脱液预热至 65-70℃ 备用。
6. 由于尿液中游离 DNA 含量低，Nanodrop 等微量分光光度计不能准确定量 DNA 含量。建议采用 Qubit 或 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测提取 DNA 含量。

【基本信息】

生产企业：简石生物技术（浙江）有限公司

住所/生产地址：浙江省余姚市中意宁波生态园兴舜路 36 号 11 幢

网 址：www.jianshibio.com

售后服务单位名称：简石生物技术（浙江）有限公司

联系方式：010-58235382

【医疗器械生产备案凭证编号】浙甬食药监械生产备 20220001 号

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】浙甬械备 20220183 号

【说明书核准及修改日期】2022 年 7 月 18 日