尿液DNA提取试剂盒（离心柱）

使用说明书（Ver.1.1.3）

产品特点

- ✧ 从高达40毫升的尿液中轻松地纯化细胞DNA/cell-free DNA。
- ✧ 试剂盒配套的尿液稳定剂（UCB）可以使DNA在室温下稳定保存长达1个月。
- ✧ 纯化柱设计确保DNA适用于所有敏感的下游应用，包括qPCR、DNA测序、芯片和DNA甲基化分析等。

产品货号：

TD361-10（10次反应）

TD361-50（50次反应）

扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份 1

注意事项 1

产品特性 1

产品描述 2

溶液制备 2

操作步骤 3

简易流程图 4

附录 5

组件查询 6

补充组件 7

产品组份

试剂盒组成	10次	50次	保存
蛋白酶K溶液（20mg/ml）	500μl	1mlx2	-20℃
尿液稳定剂	30ml	140ml	室温
纯化珠	300μl	1ml	室温
尿液细胞消化液	5ml	20ml	室温
基因组DNA裂解液	10ml	50ml	室温
尿液DNA洗涤液1	3ml	10ml	室温
尿液DNA洗涤液2（未添加乙醇）	3ml	12ml	室温
DNA洗脱液	1ml	4ml	室温
1号C-S纯化柱	10个	50个	室温
2ml收集管	20个	100个	室温

注意事项

- ✧ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ✧ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。
- ✧ 环境温度低时，消化液或者裂解液可能出现析出和沉淀，可以在 37℃水浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。

产品特性

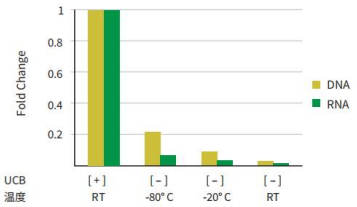
- ✧ 样品来源：尿液样本，每次制备最多40ml的尿液。如有需要，样品体积可按比例增加或减少。
- ✧ DNA质量：高质量的DNA可用于下游应用，如PCR、亚硫酸盐处理/甲基化检测、芯片等。
- ✧ DNA产量：纯化柱的DNA结合容量为5 μg。请注意，DNA产量可能会因尿液本身而异。女性尿液通常比男性尿液产生更多的DNA。健康女性个体的尿液DNA平均范围为6 - 1000 ng/ml。健康男性个体的DNA平均范围2-20ng/ml。

- ✧ DNA大小：能够回收100 bp到23 kbDNA片段。
- ✧ 所需设备：离心机、微离心机和热块/水浴。

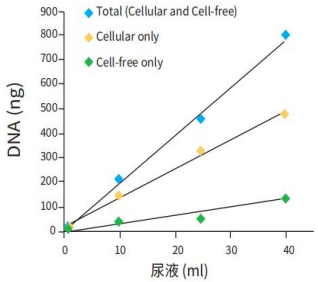
产品描述

尿液DNA提取试剂盒是一种创新产品，旨在快速、可靠地从40ml的尿液中分离细胞DNA/cell-free DNA。该产品所配制的尿液DNA稳定剂为独特配制，其也可作为沉淀试剂。采集尿液后，通过添加尿液稳定剂（UCB），总尿液（细胞和cell-free）或无细胞尿液可以在室温下保存长达一个月。准备提取尿液DNA时，只需加入纯化珠，振荡并离心以收集沉淀物。沉淀后，通过化学裂解和酶消化从沉淀物中提取DNA。随后使用核酸纯化柱IC-S对DNA进行纯化和浓缩。使用尿液DNA提取试剂盒分离的尿液DNA非常适合于qPCR、芯片、甲基化分析和其他下游应用。

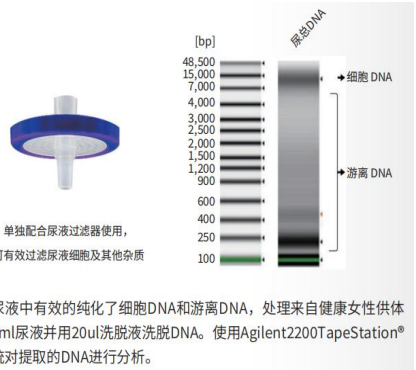
沉淀　　蛋白酶K消化　　DNA纯化



尿液稳定剂(UCB)相比传统的方法提供了更稳定的保存方式。尿液(添加或没添加UCB)保存使用不同的存储条件:室温(RT)、-20C、保存2周后，纯化总DNA(黄色)和总RNA(绿色)使用尿液DNA提取试剂盒或其他RNA提取试剂盒，分别通过qPCR分析。



使用尿液DNA提取试剂盒提取健康受试者的尿液，DNA产量随尿液的增加而线性增加。分别从1ml、10ml、25ml、40ml尿液中采用尿液DNA提取试剂盒提取DNA。DNA浓度使用定量qPCR检测。



从尿液中有效的纯化了细胞DNA和游离DNA，处理来自健康女性供体的5ml尿液并用20ul洗脱液洗脱DNA。使用Agilent2200TapeStation®系统对提取的DNA进行分析。

溶液制备

- ✧ 将48ml 100%乙醇（52ml 95%乙醇）加入12ml尿液DNA洗涤缓冲液2中，添加好乙醇后在试剂瓶上做好标记！
- ✧ 选择性添加项：如遇到难处理样品，可以考虑向基因组DNA裂解液中加入β-巯基乙醇（用户自备），最终稀释为0.5%（v/v），即每50ml加入250μl。

操作步骤

从≤40ml的样品中提取DNA

除非特殊说明，一般在常温（15-30℃）进行以下操作步骤。以下操作步骤分3个部分：

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。 （如果只需要细胞内或者游离的 DNA，操作步骤见附录）

1. 将40ml的尿液转移到合适的离心管内。
   注：如果处理≤1毫升的尿液，请使用微离心管。
   如果处理>1毫升至14毫升的尿液，请使用15毫升的锥形管。
   如果处理> 14毫升至40毫升的尿液，请使用50毫升的锥形管。
2. 添加70μl的尿液稳定剂到每1ml的样品中，涡旋混匀。（例如350μl的尿液稳定剂到5ml的尿液样品中），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. 如果处理≤14ml的尿液添加10μl纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），如果处理14-40ml的尿液，需要添加20μl纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）。
4. 在3000xg下离心15分钟。收集细胞沉淀。（如果从尿液中难以裂解的革兰氏阳性菌、真菌、酵母或其他样本中分离DNA，请参阅（附录B））

B. 蛋白消化。

1. 不要搅动细胞沉淀，缓慢倒出或去除上清，大约保留100-400μl的沉淀物。
   建议：如果尿液处理量在15-40ml之间，大约应保留200μl沉淀物。
   注意：您可以通过向沉淀物中加入无DNase/RNase水来调整体积为100-400μl。
2. 向上述沉淀物中加入相同体积的尿液细胞消化液（例如，向200μl沉淀物中加入200μl尿液细胞消化液）。通过移液吹打或振荡将沉淀物充分重悬。
3. 添加5%（v/v）的蛋白酶K到重悬的细胞沉淀中。（例如20μl蛋白酶K到400μl混合物中），涡旋混匀，在55℃下孵育30分钟。

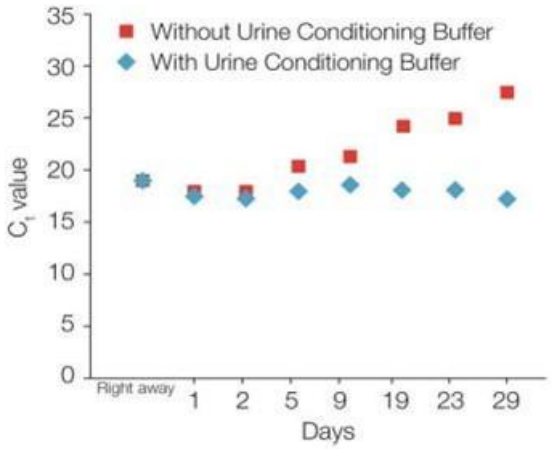
C. DNA纯化。（所有离心步骤均在≥16000xg下进行，除非特殊说明）

1. 添加1倍体积的基因组DNA裂解液到消化完后的混合液中。（例如，添加420μl的基因组DNA裂解液到420μl消化后的混合液中。）
2. 将全部样品转移到1号C-S纯化柱中，1号C-S纯化柱套在一个收集管里。离心1分钟后去除滤出液。 （如果样品体积超过800μl需要反复填充，因为纯化柱最大容积为800μl）
3. 将1号C-S纯化柱套在1个新的收集管里。
4. 添加200μl的尿液洗涤液1到1号C-S纯化柱中，离心1分钟，去除滤出液。
5. 添加700μl的尿液洗涤液2到1号C-S纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。
6. 添加200μl的尿液洗涤液2到1号C-S纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。

7. 将1号C-S纯化柱移至干净的1.5ml离心管中，直接添加≥10μl的DNA洗脱液到纯化柱基质上（洗脱液事先在65-70℃水浴中预热效果更好）室温下放置3-5分钟，全速离心1分钟来洗脱DNA。
8. 所洗脱的DNA可立即使用或在≤-20℃下储存以备将来使用。

简易流程图

(A) 总DNA沉淀 （细胞内和游离）	尿液体积	≤1ml	1-14ml	14-40ml
	配套的离心管	1.5ml离心管	15ml离心管	50ml离心管
	尿液稳定剂	70μl/ml尿液		
	纯化珠	10μl	10μl	20μl
		3000xg下离心15分钟		
(B) 蛋白消化. (最小的沉淀物体积)	尿液细胞沉淀体积	100μl	100μl	200μl
	尿液细胞消化液	100μl	100μl	200μl
	蛋白酶K 溶液	10μl	10μl	20μl
		55℃下孵育30分钟		
(C) DNA纯化	基因组DNA裂解液	210μl	210μl	420μl
		转移到核酸纯化柱1号C-S纯化柱中		
	尿液洗涤液 1	200μl		
	尿液洗涤液 2	700μl， 200μl		
	DNA 洗脱液	≥10μl		



尿液中的DNA可以在室温下保存长达1个月。将添加了UCB的总（细胞和游离）尿液DNA与和不含尿液稳定剂的样本一起放置了29天。使用尿液DNA提取试剂盒处理健康女性的5ml尿液，并使用Femto™人类DNA定量试剂盒（Zymo Research，E2005）通过qPCR测定Ct值。

附录A（分别提取细胞和游离DNA的步骤 ）

1. 提取细胞内DNA
   a. 在3000xg离心力下离心40ml尿液。
   b. 接下来按照主操作步骤的 （B）蛋白消化+ （C）DNA纯化步骤进行后续的处理。
2. 提取游离DNA
   a. 在3000xg离心力下离心40ml尿液15分钟。
   b. 不要搅动细胞沉淀，将上清转移到一个合适的离心管内。
   c. 添加70μl的尿液稳定剂到每1ml的样品中，涡旋混匀。（例如350μl的尿液稳定剂到5ml的尿液样品）。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。
   d. 如果处理≤14ml的尿液添加10μl纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），如果处理14-40ml的尿液，需要添加20μl纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）。
   e. 在3000xg下离心15分钟。
   f. 接下来按照主操作步骤的 （B）蛋白消化+ （C）DNA纯化步骤进行后续的处理。

附录B（如何处理难以裂解的样本）

在继续之前，请订购筒石生物的裂解管（0.1&0.5mm）、裂解液、3号F纯化柱（红）和额外的收集管（2ml）。以下方案是为了裂解尿液中难以裂解的微生物（如革兰氏阳性菌、酵母菌和其他真菌）而改编的方案。

样品裂解

1. 不干扰沉淀物，缓慢倒出或移液尿液上清液，留下100-400μl的沉淀物。将沉淀物转移到一个裂解管（0.1&0.5mm）中，然后加入裂解液，使其最终体积为800μl（例如，向100μl沉淀物中加入700μl裂解液）。
2. 将其固定在配有2ml管支架组件的样品破碎仪（TI2019）中，以最大HZ/速度处理5分钟。注意：使用高速细胞破碎器（例如便携式Xpedition™样品处理器、FastPrep®-24或类似产品）时，处理时间可能只有40秒。有关操作信息，请参阅制造商的说明书。
3. 以10，000xg的速度离心裂解管（0.1&0.5mm）1分钟。
4. 将400μl上清液转移到一个3号F纯化柱（红）和收集管中。以10，000xg的速度离心1分钟。保留滤出液，丢弃过滤器。

DNA纯化（所有离心步骤均在≥16000xg下进行，除非特殊说明）

1. 向滤出液中加入1200μl基因组DNA裂解液。并用移液器多次吹打混匀。
2. 将上述800μl混合物转移到1号C-S纯化柱中，1号C-S纯化柱套在一个收集管里。离心1分钟后去除滤出液。（如果样品体积超过800μl需要反复填充，因为柱子最大容积为800μl）
3. 将1号C-S纯化柱套在1个新的收集管里。
4. 添加200μl的尿液洗涤液1到1号C-S纯化柱中，离心1分钟，去除滤出液。
5. 添加700μl的尿液洗涤液2到1号C-S纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。
6. 添加200μl的尿液洗涤液2到1号C-S纯化柱中，离心1分钟。去除滤出液。

7. 将1号C-S纯化柱移至干净的1.5ml离心管中，直接添加≥10μl的DNA洗脱液到纯化柱基质上（洗脱液事先在65-70℃水浴中预热效果更好）.室温下放置3-5分钟，全速离心1分钟来洗脱DNA。

   注意：如果DNA浓度>100ng/μl，则大部分DNA将在第一次洗脱中被回收，但将第一次洗脱的洗脱液再次加载到纯化柱上，室温下孵育3-5分钟，并再次离心可以增加总产量。

组件查询

组件名称	货号	规格	保存
蛋白酶K溶液（20mg/ml）	TD3001-2-0.5	500μl	-20℃
	TD3001-2-1	1ml	
尿液稳定剂	TD3061-1-30	30ml	室温
	TD3061-1-140	140ml	
纯化珠	TD3061-2	300μl	室温
	TD3061-2-1	1ml	
尿液细胞消化液	TD3061-3-5	5ml	室温
	TD3061-3-20	20ml	
基因组DNA裂解液	TD3004-1-10	10ml	室温
	TD3004-1-50	50ml	
尿液DNA洗涤液1	TD3061-4-3	3ml	室温
	TD3061-4-10	10ml	
尿液DNA洗涤液2（未添加乙醇）	TD3061-5-3	3ml	室温
	TD3061-5-12	12ml	
DNA洗脱液	TD3004-4-1	1ml	室温
	TD3004-4-4	4ml	
1号C-S纯化柱	TC1015-10	10个/包	室温
	TC1015-50	50个/包	
2ml收集管	TC1001-20	20个/包	室温
	TC1001-50	50个/包	

补充组件（处理难裂解样品）

组件名称	货号	规格	保存
裂解管（0.1&0.5mm）	TS6012-50	50管	室温
裂解液	TD6001-3-40	40ml	室温
	TD6001-3-160	160ml	室温
3号F纯化柱（红）	TD1057-50	50个/包	室温
2ml收集管	TC1001-50	50个/包	室温