

## 病原体核酸纯化试剂盒说明书

### 产品组成

病原体核酸纯化试剂盒	50 次制备
Cat. No.	4011050
样本裂解管	50 个
核酸纯化柱	50 个
2 ml 离心管	50 个
蛋白酶 K 贮存液	1.2 ml×2
Buffer AT	40 ml
Buffer SL	12 ml
Buffer DX	500 μl
Buffer WA（浓缩液）	12 ml
Buffer WB（浓缩液）	10 ml
Buffer TE	6 ml
说明书	1 份

### 产品储存与有效期

1. 蛋白酶 K 贮存液请于 - 20°C 贮存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（0~30°C），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8°C，可延长产品的有效期至两年以上。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本产品适合从各种样本（如全血、拭子、生物液体和培养物）中纯化各类病原体（细菌、真菌、病毒）核酸。通过化学和机械两种裂解方法释放各类病原体中的核酸，经柱纯化技术吸附核酸，核酸经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、2 ml 离心管和移液器吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 水浴锅和旋涡振荡器

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 56°C 和 70°C，将 Buffer AT 和 Buffer TE 温育至 56°C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 虽然对于一些革兰氏阴性菌来说，化学裂解就足够了，但革兰氏阳性菌以及酵母和其他真菌的细胞壁需要通过其他方法破坏。为了最大限度地提高这些细胞的裂解效率，本试剂盒提供了样本裂解管进行机械破坏。Simgen 样本裂解管有 L (Cat. No.: C-001-1)、M (Cat. No.: C-001-2) 和 S (Cat. No.: C-001-3) 三种规格，本试剂盒提供的是针对细菌和真菌的通用型样本裂解管 M，若检测的病原体是细菌，可单独购买针对性更强的样本裂解管 S。

## 操作步骤

全血样本请按步骤 1a 操作；

拭子样本请按步骤 1b 操作；

生物液体或培养细胞样本请按步骤 1c 操作；

### 1a. 从全血中分离纯化病原体核酸：

直接吸取 400  $\mu$ l 全血样本加入至样本裂解管中，再加入 100  $\mu$ l Buffer AT，**剧烈旋涡振荡** 10 分钟，低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底，小心吸取 400  $\mu$ l 上清至洁净的 1.5 ml 离心管中（如果样本裂解管中产生了大量泡沫，可以加入 5  $\mu$ l Buffer DX，轻轻摇晃至泡沫消失）。

\* 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的样本进行病原体核酸的分离纯化。

\* 请确保剧烈旋涡振荡，使得病原体被充分研磨裂解，提高核酸得率。

### 1b. 眼、鼻、咽或其他拭子中分离纯化病原体核酸：

从拭子上切下尖端，放入自备的 2 ml 离心管中，加入 650  $\mu$ l Buffer AT，将离心管放在热摇床上，在 56°C 下以 600 rpm 的速度连续振荡 10 分钟，小心地将所有液体转移到样本裂解管中，**剧烈旋涡振荡** 10 分钟，低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底，小心吸取 400  $\mu$ l 上清至洁净的 1.5 ml 离心管中（如果样本裂解管中产生了大量泡沫，可以加入 5  $\mu$ l Buffer DX，轻轻摇晃至泡沫消失）。

### 1c. 生物液体或培养物中分离纯化病原体核酸：

向样本裂解管中加入最多 1.5 ml 的生物液体或液体培养物，并以最大速度 (>14000 $\times$ g) 离心 5 分钟。用移液器吸弃上清液，小心不要移走瓷珠。加入 500  $\mu$ l Buffer AT，**剧烈旋涡振荡** 10 分钟，低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底，小心吸取 400  $\mu$ l 上清至洁净的 1.5 ml 离心管中（如果样本裂解管中产生了大量泡沫，可以加入 5  $\mu$ l Buffer DX，轻轻摇晃至泡沫消失）。

\* 如有必要，可重复收集生物液体或液体培养物。

2. 加入 40  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，旋涡振荡约 15 秒，将 1.5 ml 离心管置于 56°C 水浴 10 分钟。

3. 加入 200  $\mu$ l Buffer SL，旋涡振荡约 15 秒混匀。将 1.5 ml 离心管置于 70°C 水浴 10 分钟。低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底。

\* 如果从非常新鲜的样本中提取 DNA，可能会将部分 RNA 一起分离纯化出来，但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验。如果要彻底除去 RNA，可在本步骤中补加 5  $\mu$ l RNase A (50 mg/ml，需单独订购，Simgen Cat. No.: 8001001)。

4. 加入 300  $\mu$ l 无水乙醇，盖上管盖，温和地翻转 4~6 次混和均匀。

5. 吸取 600  $\mu$ l 步骤 4 中的溶液加入到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，吸取剩余的混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心 1 分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

10. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50~100  $\mu$ l 56°C 温育的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。