

Version: AA 4.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy Clinic DNA Kit

## 微量/临床样品基因组DNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AA1301

### 01/产品组分

序号	组分	50次 AA1301-A	50次 AA1301-B
1	裂解液 ML	11 mL	11 mL
2	结合液 CB	15 mL	15 mL
3	抑制物去除液 IR	25 mL	25 mL
4	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前加入 60 mL 无水乙醇	
5	Poly Carrier	200 µL	200 µL
6	洗脱缓冲液 EB	10 mL	10 mL
7	蛋白酶 K 溶液 (20 mg/mL)	-	1 mL
8	吸附柱 AC 和收集管	50 套	50 套

### 02/保存条件

蛋白酶 K 溶液、Poly Carrier 于-20°C保存，其它组分室温（15-25°C）保存。

### 03/产品概述

本试剂盒适用于从微量血液、法医材料、干血点、药签、口香糖、尿液等微量样品中分离纯化基因组 DNA，操作简单方便，可在 2 h 内完成单个或多个样本的提取工作。本试剂盒采用特制的进口 DNA 吸附柱和独特的缓冲液系统，各种来源样品裂解消化处理后，DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜（特别配备了 Poly Carrier 可以从体系中轻松捕获微量核酸），再通过一系列快速的漂洗、离心的步骤，将盐、细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净的基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。纯化后的 DNA 无杂质和 PCR 抑制剂，可直接适用于 PCR 分析。

## 04/自备材料

无水乙醇、RNase Free 水、1 M DTT（用于部分样品）、血卡（用于干血点）

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25°C）下进行。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热备用。部分样品需要准备 1 M DTT。
- ◇ 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- ◇ Poly Carrier 使用方法：如果起始处理量很少（例如小于 10  $\mu\text{L}$  全血和法医样品），我们推荐使用 Poly Carrier，如果预期有较大 DNA 产量，用户可以根据需要选择是否加入 Poly Carrier。使用时在每个样品提取所需结合液 CB 中加入 2  $\mu\text{L}$  PolyCarrier 储存溶液，将结合液 CB 与 Poly Carrier 溶液充分颠倒混匀即可（结合液 CB 容易起泡沫，请勿使用涡旋振荡混匀）。也可根据样品数量，在总共需要的结合液 CB 中加入需要的 Poly Carrier 混匀备用。混合液在室温 24 h 内稳定。
- ◇ Poly Carrier 加入过多造成 DNA 洗脱液中 Poly Carrier 浓度过高，下游 PCR 反应可能受干扰，加入过少可能并不能帮助提高 DNA 产量和 PCR 灵敏度，因此加入量应该在具体试验中调整以得到最佳效果。
- ◇ 由于 Poly Carrier 本身是小核酸，所以得到的基因组测定 OD260 值会比真实值偏大，建议将得到的基因组直接用 PCR 进行检测。
- ◇ 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 首次使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

## 06/使用方案

### 1. 血液样品

- a. 取 1-100  $\mu\text{L}$  血液到 1.5 mL 的离心管中。
- b. 如果不足 100  $\mu\text{L}$ ，加入裂解液 ML 补足到 100  $\mu\text{L}$ 。
- c. 加入 10  $\mu\text{L}$  的蛋白酶 K（20 mg/mL）溶液，充分混匀，再加入 100  $\mu\text{L}$  结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在 70°C 放置 10 min。  
▲ 如果处理样品 < 10  $\mu\text{L}$ ，建议在 100  $\mu\text{L}$  结合液 CB 中加入 1  $\mu\text{L}$  Poly Carrier 储存溶液。
- d. 冷却后加入 50  $\mu\text{L}$  无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置 3 min。

▲如果周围环境高于25°C，乙醇需要冰上预冷后再加入。

e. 接操作步骤项下7。

## 2. 干血点

a. 用打孔机打孔的方法在血卡（上面有干血点）上冲取3 mm（1/8英寸）直径血卡小片，最多将3个直径3 mm血卡小片放入1.5 mL的离心管中。

▲一般血液应该点在特定纸或者血卡上面干燥，如903 paper or IsoCode paper（Schleicher & Schuell），BloodstainCard or FTA Card（Whatman），Guthrie test cards, or comparable blood cards。

b. 加入180 μL裂解液ML。

c. 加入20 μL的蛋白酶K（20 mg/mL）溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。

d. 56°C轨道摇床上面900 rpm（1,005×g）振摇1 h。

▲如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者heating block上面进行，每10 min涡旋振荡10 s帮助裂解。

e. 加入200 μL结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀。

▲如果只处理一个3 mm血卡小片，建议在200 μL结合液CB中加入2 μL Poly Carrier储存溶液。

f. 70°C轨道摇床上面900 rpm（1,005×g）振摇10 min。

▲如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者heating block上面进行，每3 min涡旋振荡10 s帮助裂解。

g. 接操作步骤项下7。

## 3. 组织样品

a. 新鲜或者解冻的组织在液氮中研磨成细粉后或者用解剖刀切成小碎块（切成微块可以提高产量）后取<10 mg，转入装有180 μL裂解液ML的1.5 mL离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入20 μL的蛋白酶K溶液（20 mg/mL），立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 将裂解物放置在56 °C水浴1-3 h或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

d. 加入200 μL结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀。

▲如果处理样品量少，建议在200 μL结合液CB中加入2 μL Poly Carrier储存溶液。

e. 冷却后加入200 μL无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置5 min。

▲如果周围环境高于25°C，乙醇需要冰上预冷后再加入。

f. 接操作步骤项下7。

## 4. 口香糖

a. 将30 mg口香糖切成小块放入1.5 mL离心管，加入280 μL裂解液ML和20 μL的蛋白酶K溶液（20 mg/mL），立刻涡旋振荡充分混匀。

b. 56°C轨道摇床上面900 rpm（1,005×g）振摇至少3 h。

▲如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者heating block上面进行，每10 min涡旋振荡10 s帮助裂解。

- c. 加入200  $\mu\text{L}$ 结合液CB（加入2  $\mu\text{L}$  Poly Carrier），立刻涡旋振荡充分混匀。
- d. 70°C轨道摇床上面900 rpm（1,005 $\times$ g）振摇1 h。
  - ▲如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者heating block上面进行，每10 min涡旋振荡10 s帮助裂解。
- e. 冷却后加200  $\mu\text{L}$ 无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀。
- f. 最高速（约12,500 rpm（14,500 $\times$ g））离心1 min，取上清加入一个吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心30-60 s，弃废液。
- g. 接操作步骤项下8。

## 5. 法医材料

- a1. 剪下1  $\text{cm}^2$ 烟头或者过滤嘴外层纸，切成6小块放入1.5 mL离心管，加入300  $\mu\text{L}$ 裂解液ML和20  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL），立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤b。
- a2. 剪下0.5-2.5  $\text{cm}^2$ 信封或者邮票，切成小块放入1.5 mL离心管，加入300  $\mu\text{L}$ 裂解液ML和20  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL），立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤b。
- a3. 从毛发根部毛囊处开始剪下0.5-1 cm长度毛发放入1.5 mL离心管，加入280  $\mu\text{L}$ 裂解液ML和20  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL）和20  $\mu\text{L}$  1 M DTT溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤b。
- a4. 将指甲剪成小块放入1.5 mL离心管，加入280  $\mu\text{L}$ 裂解液ML和20  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL）和20  $\mu\text{L}$  1 M DTT溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤b。
- a5. 将约0.5  $\text{cm}^2$ 信封沾染了血液、唾液、精液的材料剪成小块放入1.5 mL离心管，加入300  $\mu\text{L}$ 裂解液ML和20  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL）（如果是精液需另加入20  $\mu\text{L}$  1 M DTT溶液），立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤b。
- b. 56°C轨道摇床上面900 rpm（1,005 $\times$ g）振摇1 h。
  - ▲如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者heating block上面进行，每10 min涡旋振荡10 s帮助裂解。
  - ▲一般毛发1 h裂解可以完成，如果不完全可以延长时间。指甲等难裂解物建议过夜裂解。最后没有裂解的不溶物在后续步骤c中会通过离心去除。
- c. 加入200  $\mu\text{L}$ 结合液CB（加入2  $\mu\text{L}$  Poly Carrier），立刻涡旋振荡充分混匀。
- d. 70°C轨道摇床上面900 rpm（1,005 $\times$ g）振摇1 h。
- e. 最高速（约12,500 rpm）离心1 min，取上清加入一个吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心30-60 s，弃废液。
- f. 接操作步骤项下8。

## 6. 微切割样品（包括福尔马林固定的微切割样品）

- a. 加入15  $\mu\text{L}$ 裂解液ML到0.2 mL离心管中，放入微切割样品。
- b. 加入10  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K溶液（20 mg/mL），立刻涡旋振荡充分混匀。

- c. 56°C水浴3 h（福尔马林样品16 h）至裂解完全，中间不时颠倒涡旋。
- d. 加入15 μL裂解液ML，再加入50 μL结合液CB（加入1 μL Poly Carrier），立刻涡旋振荡充分混匀。
- e. 冷却后加入50 μL无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置5 min。
- ▲如果周围环境高于25 °C，乙醇需要冰上预冷后再加入。
- f. 接操作步骤项下7。
7. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱AC中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500×g）离心30-60 s，弃废液。
8. 加入500 μL抑制物去除液IR，12,000 rpm（13,400×g）离心30 s，弃废液。
9. 加入600 μL漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心30 s，弃废液，重复该步骤一遍。
10. 将吸附柱AC放回空收集管中，12,500 rpm（14,500×g）离心2 min，尽量除去漂洗液。
11. 取出吸附柱AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加20-50 μL洗脱缓冲液EB（事先在65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置2-5 min，12,000 rpm（13,400×g）离心1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm（13,400×g）离心1 min。
- ▲洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要DNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于20 μL，体积小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。
12. DNA可以存放在2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在-20°C。

## 07/流程简图



裂解：血液、干血点、组织、口香糖、法医材料（烟头或过滤嘴外层纸、信封邮票、毛发毛囊、指甲、沾染血液、精液、唾液的材料等、包括福尔马林固定的微切割样品）适量**裂解液ML**



去蛋白：适量**蛋白酶K**，适量**结合液CB**，适量**Poly Carrier**



结合：适量无水乙醇，将混合物加入预处理的**吸附柱AC**  
14,500×g离心30-60 s



去抑制物：500 μL**抑制物去除液IR**，13,400×g离心30 s  
去盐离子：600 μL**漂洗液WB**(检查是否已加入无水乙醇!)  
13,400×g离心30 s，两次  
去残留乙醇：14,500×g空甩2 min



洗脱：20-50 μL**洗脱液EB**（65-70°C预热）  
室温静置2-5 min，13,400×g离心1 min  
可重复洗脱一次，长期储存-20°C

## 08/相关产品

- AA1906 蛋白酶K（10 mg/mL）
- AC1706 Poly Carrier 核酸助沉剂
- AC1707 Glycogen 核酸助沉剂
- AC1001 SPARKeasy 微量样品RNA快速提取试剂盒
- AC1709 RNase Free and DNase Free纯水
- AF0802 2×SparkHiFi Max Master Mix（with dye）
- AF0803 2×SparkHiFi Max Master Mix（without dye）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

