

Extiquick™ 游离 DNA 提取试剂盒 (1 ~ 5 mL 血浆/血清)

操作说明书

(Cat#EX002, Version 1.4)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co., Ltd

For Research Use Only.

Not For Use in Diagnostic Procedures.

仅供科研使用

产品组成

主货号：EX002 规格：24 preps / 96 preps

组 分	24 preps (EX002-024)	96 preps (EX002-096)	保存条件
Proteinase K	25 mg	90 mg	2 ~ 8 °C
Protease Dissolve Buffer	1.25 mL	4.5 mL	2 ~ 8 °C
cfDNA Binding Buffer	96 mL	384 mL	室温
cfDNA Lysis Buffer	31.2 mL	124.8 mL	室温
cfDNA Wash Buffer I	24 mL	96 mL	室温
cfDNA Wash Buffer II	6 mL	20 mL	室温
Elution Buffer	720 µL	2.88 mL	室温
Silic Beads A	480 µL	1.92 mL	2 ~ 8 °C

保存与运输条件

请严格按照表格所示的温度进行保存，2 ~ 8 °C运输。

- ！ 注意：**1) Proteinase K 干粉状态可在 2 ~ 8 °C保存两年，溶解后的 Proteinase K 需置于 -30 ~ -15 °C保存；
- 2) Silic Beads A 严禁冷冻或离心。

产品概述

Extiquick™ 游离 DNA 提取试剂盒是基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，高效吸附血清、血浆中的游离 DNA，并结合配套清洗试剂，最大程度地去除蛋白质及其他杂质，达到快速分离、纯化核酸的目的。本产品操作过程简单快速，分离出的游离 DNA 纯度高、完整性好且质量稳定，可直接用于定量 PCR 及二代测序文库构建等下游分子实验。

适用范围

本产品适用于 1 ~ 5 mL 的血清、血浆等样本游离 DNA 的分离与纯化。

注意事项

 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项：

1. 请根据试剂标签的指示量加入 Protease Dissolve Buffer，轻轻颠倒混匀数次，置于室温下 10 min，使 Proteinase K 充分溶解；溶液终浓度为 20 mg/mL。建议 Proteinase K 溶液分装保存于 -30 ~ -15 °C，避免反复冻融影响活性。
2. cfDNA Lysis Buffer 及 cfDNA Binding Buffer 在保存环境温度较低时会有晶体析出，使用前需要加热溶解（建议温度为 58 °C），待晶体溶解后方可使用。
3. cfDNA Wash Buffer II 请务必按照瓶身标签所示，加入对应量的无水乙醇后方可使用。
4. Silic Beads A 在使用前请务必置于室温下平衡 30 min，并充分振荡混匀，使磁珠均匀分散后方可使用。此组分严禁冷冻或者离心，此操作将导致试剂失效而无法使用。
5. 在血液样本采集的步骤中，强烈建议使用 cfDNA 专用采血管以达到最佳的实验效果，并严格按照采血管使用说明进行保存及运输；如使用常规采血管，建议第一时间分离血清或血浆样本，并保存于 -80°C，干冰运输，避免反复冻融。
6. 使用含肝素抗凝剂的采血管收集的血样，不可用于 PCR 及二代测序相关实验。

实验前准备

1. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
*	无水乙醇	/

^ * 常规实验室供应商品牌即可

2. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	冷冻离心机	转子需要适配 10 mL 采血管
*	台式离心机	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	恒温水浴锅	/
*	移液器	/
AllSheng# AS-17150-00	全自动核酸提取仪 Auto-Pure 24D	自动法匹配的仪器； 可选择其它同类产品
ThermoFisher# Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法的 DNA 定量系统的其它同类产品
Agilent #G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品
*	15 mL 灭菌离心管	建议选择无核酸酶的产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶的产品
*	1000 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	200 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	0.5 - 10 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
WisGen#QC001-R	xQuant™管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® 荧光计的其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™检测联管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® Flex 荧光计的其它同类产品
WisGen#MR-A-04	xMag™磁力架 (15 mL*4 孔)	手动法匹配的耗材； 可选择其它同类产品
WisGen#MR-B-16	xMag™磁力架 (1.5 mL*16 孔)	手动法匹配的耗材； 可选择其它同类产品
AllSheng# AS-17151-01	10 mL 试剂条	可选择适配全自动核酸提取仪 Auto-Pure 24D 的其它同类产品
AllSheng# AS-17151-02	10 mL 磁套棒	可选择适配全自动核酸提取仪 Auto-Pure 24D 的其它同类产品
AllSheng# AS-17151-04	10 mL 试剂条托架	可选择适配全自动核酸提取仪 Auto-Pure 24D 的其它同类产品

⬆️ * 常规实验室供应商品牌即可

实验流程 1：手动法操作步骤

1. 样本处理

1.1 将装有全血的 10 mL cf DNA 采血管置于冷冻离心机中，4000 rpm 离心 20 min，根据离心分层后血浆的颜色，按照下表“解决办法”进行操作。

血浆颜色	状态	解决办法
淡黄色、半透明黄色	正常	正常样本，按照步骤 1.2 进行
淡红色	轻微溶血	重复步骤 1.1 一次，再进行步骤 1.2
乳白色	脂质过多	重复步骤 1.1 一次，再进行步骤 1.2
红色	严重溶血	重复步骤 1.1 一次，如果上清颜色呈淡红色，则进行步骤 1.2；如果颜色仍旧偏红，则建议重新取样

1.2 离心后小心地将上层透明的淡黄色血浆样本分装于 1.5 mL 离心管中，注意不要吸到白色沉淀。已分离的血清、血浆等样本，可直接进行步骤 1.3 的实验操作，无需进行此步骤。

！ 注意：取上层血浆时，请注意不要吸到中间层的白色细胞层，建议弃掉最后 500 μ L~1 mL 的血浆，以免带入白细胞造成污染；如果不小心吸入或触碰，请重新离心后再进行分装。

1.3 取其中 2 ~ 3 mL 血浆、血清等样本，12000 rpm 离心 3 min，将上清液转至 15 mL 离心管中用作后续实验。

！ 注意：一般情况下，2 ~ 3 mL 血浆/血清提取出的 DNA 量可以满足常规定量 PCR 及二代测序文库构建的需求，血浆/血清投入量在 1 ~ 5 mL 范围内，无需改变其它试剂的使用量。

2. 核酸提取

2.1 向步骤 1.3 的 15 mL 离心管中加入 40 μ L Proteinase K (20 mg/mL) 和 1.3 mL cfDNA Lysis Buffer 溶液，涡旋混匀 2 ~ 3 次，每次 10 sec。

! 注意：cfDNA Lysis Buffer 如有沉淀，请加热（推荐 58 $^{\circ}$ C）溶解混匀后使用。

2.2 将 15 mL 装有样本的离心管放于 58 $^{\circ}$ C 水浴中消化 25 min，结束后置于 4 $^{\circ}$ C 冷却 5 min。

2.3 加入 4 mL cfDNA Binding buffer 和 20 μ L Silic Beads A，充分混匀后，室温孵育 10 min，期间每 3 min 振荡混匀 2 ~ 3 次，每次 10 sec。

2.4 完成孵育后，将 15 mL 离心管放置于 15 mL 磁力架上静置 5 min，待溶液完全澄清后，去上清。

2.5 取下 15 mL 离心管（不要丢弃），加入 1 mL cfDNA Wash Buffer I，振荡混匀后，将全部液体转移至新的 1.5 mL 离心管内，将离心管放置于 1.5 mL 磁力架上静置 2 min；待溶液完全澄清后，取 400 μ L 澄清液加入 15 mL 离心管内，将管壁残留磁珠吹打至管底，最后用移液器将全部磁珠悬浮液吸取到磁力架上的 1.5 mL 离心管内。

2.6 当磁珠完全贴壁，溶液澄清后，去上清。

2.7 加入 1 mL cfDNA Wash Buffer II，振荡混匀 10 sec。

! 注意：使用前请务必检查 cfDNA Wash Buffer II 是否已加入无水乙醇。

2.8 将离心管瞬时离心后，置于磁力架上静置 2 min，待溶液完全澄清后，去上清。

2.9 加入 200 μ L 无水乙醇。

2.10 置于磁力架上静置 1 min，去上清；瞬时离心放回磁力架，用移液器将残留液体充分吸除。

2.11 打开管盖，室温干燥 1 ~ 2 min，使乙醇充分挥发。

！ 注意：请勿过度干燥磁珠，避免造成 DNA 洗脱效率降低。

2.12 加入 30 μ L Elution Buffer，振荡混匀后，室温孵育 5 min。

2.13 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 2 min，小心将溶液转移至新的 1.5 mL 离心管中。

2.14 洗脱后的 DNA 可直接用于后续实验，或置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

实验流程 2：仪器自动法操作步骤

本操作以奥盛 Auto-Pure 24D 全自动核酸提取仪提取为例，可同步完成 24 份样本的提取操作。

！ 注意：如使用其它品牌的全自动核酸提取仪，请结合本说明书操作步骤并咨询服务厂商。

1. 样本处理

请参考（实验流程 1）：手动法操作步骤中的“样本处理”方式进行实验。

2. 试剂条加液准备

请参照下表，向试剂条各孔位中加入相应试液：

试剂条孔位	1	2	3	4	5
试剂	cfDNA Lysis Buffer + Proteinase K+cfDNA Binding Buffer	cfDNA Wash Buffer I	cfDNA Wash Buffer II	Silic Beads A +Nuclease- Free Water	Elution Buffer
体积	1 mL + 20 μ L + 3 mL	800 μ L	800 μ L	40 μ L + 60 μ L	50 μ L

！ 注意：

- 每次吸取磁珠前请务必涡旋混匀；
- cfDNA Binding Buffer 在裂解完毕后取出手动加入，其余试剂均可提前加入；
- 试剂加板完毕请尽快上机，防止试剂挥发导致实验结果不稳定。

3. 上机提取

3.1 将 2 mL 血浆样品吸入试剂条 1 号孔位中。

3.2 将上样完毕的试剂条置于奥盛 Auto-Pure 24D 型自动核酸提取仪中，插入磁套棒，打开仪器操作软件，运行“cfDNA 裂解与消化程序”。

“cfDNA 裂解与消化程序”参数设置如下，如果原程序不慎丢失，可自行设定程序。

步骤	孔位	名称	混合时间 (min)	吸磁时间 (sec)	等待时间 (min)	容 积 (μL)	混合速度 (1~10)	温 度 (°C)
1	1	裂解消化	25	0	0	3000	5	58

3.3 将试剂条取出置于 4 °C 冷却 5 min，然后在 1 孔位中加入 3 mL cfDNA Binding Buffer，打开仪器操作软件，运行“cfDNA 提取程序”。

步骤	孔位	名称	混合时间 (min)	吸磁时间 (sec)	等待 时间 (min)	容 积 (μL)	混合 速度 (1~10)	温 度 (°C)
1	4	磁珠转移	0.5	60	0.0	100	5	OFF
2	1	DNA 结合	10.0	360	0.0	6000	7	OFF
3	2	清洗液 I	2.0	60	0.0	800	5	OFF
4	3	清洗液 II	2.0	60	1.0	800	5	OFF
5	5	洗脱	5.0	60	0.0	50	5	OFF
6	3	弃磁珠	1.0	0	0.0	800	5	OFF

4. 核酸转移

4.1 待程序运行完毕，将 5 孔的 DNA 洗脱液转移至新的 1.5 mL 离心管中，丢弃试剂条与磁套棒，完成提取。

4.2 洗脱后的 DNA 可直接用于后续实验，或置于 -20 °C 保存。

欣基（杭州）生物科技有限公司

WisGen BioSciences Co., Ltd

Add：浙江省杭州市钱塘区福城路 400 号 6 幢 8 层

Service：order@wisgen.cn Web：www.wisgen.cn

