



口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: ZP321

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP321-01 (50 次)	ZP321-02 (100 次)
裂解液 ML	20 ml	40ml
结合液 CB	20 ml	40ml
抑制物去除液 IR	25 ml	50ml
Acryl Carrier	0.5ml	1ml
蛋白酶 K	0.5 ml	1 ml
漂洗液 W2	15 ml	25ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml
吸附柱	50 个	100 个
收集管 (2ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

储存事项:

蛋白酶 K 和 Acryl Carrier 在 -20°C 保存,其他部分室温保存 12 个月不影响使用。

产品介绍:

本试剂盒采用特制的进口 DNA 吸附柱和独特的缓冲液系统,特别适合于从口腔/咽拭子中分离纯化基因组 DNA。各种来源样品裂解消化处理后 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜(特别配备了 Acryl 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。

产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 节省时间,简捷,单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
3. 配备了 Acryl Carrier 用于充分收集特别微量 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度,提取的 DNA 纯度高,质量稳定可靠,可适用于各种常规操作,包括 PCR、酶切、测序、Southern 杂交等。

注意事项:

1. 所有的离心步骤均在室温完成,使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机,如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到特定温度备用。
3. 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。
4. Acryl Carrier :
 - 1) Carrier RNA 溶液应避免反复冻融,冻融次数不能超过 3 次。所以建议在第一次使用时按自己每次的用量分装在 RNase-free 的离心管中后置于 -20°C 储存。
 - 2) Acryl Carrier 使用方法:如果起始处理量很少(口腔咽拭子上收集到的细胞很少),我们推荐使用 Acryl Carrier,如果预期有较大量 DNA 产量,用户可以根据需要选择是否加入 Carrier RNA。使用时在每个样品提取所需结合液 CB 中加入 4-8µl Acryl Carrier 储存溶液,将结合液 CB 与 Acryl 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 中加入总共需要的 Carrier RNA 混匀备用。混合液在室温 24 小时内稳定。
 - 3) Acryl Carrier 加入过多造成 DNA 洗脱液中 Acryl 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 敏感度,因此加入量应该在具体试验中调整以得到最佳效果。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 W2 中加入 60ml 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！

取样：取一根医用消毒棉签或采用我公司专用口腔采样刷（手不要碰触脱脂棉部位），伸进口腔，紧靠脸颊内侧来回刮拭 20 次（不时旋转棉棒），需充分接触口腔粘膜。

注意事项：避免用手触及棉签，采集前可先用清水轻轻漱口。为防止样本被食物或者饮料污染，取样前 30 分钟内应该避免进食或者饮水。

1. a.用剪刀将棉签部分从其杆上剪下（如果使用专用口腔刷，可直接推动手柄使用），放入已经加入 400µl 裂解液 ML 的 2ml 离心管中。也可以先备好加入裂解液 ML 的 2ml 管去采样；采样后，强烈振荡混匀。可 4-25°C 放置 1 天，更长时间的保存采样，建议使用我公司的口腔细胞保存液。
b.若使用了我公司口腔细胞保存液，不用再加裂解液 ML,直接进行第二步操作。
2. 再加入 10µl 的蛋白酶 K (10mg/ml)溶液，**立刻涡旋振荡充分混匀**，56°C 放置 1 小时，期间每 10 分钟涡旋混匀 10 秒。
3. 加入 400µl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70°C放置 10 分钟。
如果拭子上细胞数量少，导致提取的基因组 DNA 产量过低，可以在 400µl 结合液 CB 中加入 4-8µl Acryl Carrier.
4. 冷却后加 400µl 无水乙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**。简短离心以除去管盖内壁的液滴，收集所有的液体到管底。
如果周围环境高于 25°C,乙醇需要冰上预冷后再加入。
5. 将上一步混合物分加入一个吸附柱中，（吸附柱放入收集管中。）13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。总液量超过 800ul，需分两次过柱。
棉签的棉花货采样刷可能还吸附一些液体，如果要提高产量，可以用干净镊子夹挤出液体后弃棉花，减少棉花上液体残留。
6. 加入 500µl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
7. 加入 500µl 漂洗液 W2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
8. 加入 500µl 漂洗液 W2，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 将吸附柱放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 40 - 80µl 洗脱缓冲液 TE（洗脱缓冲液事先在 65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。
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 20µl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
11. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 - 20°C。

问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低或者洗脱液中无 DNA	* Acryl Carrier 没有加入到结合液 CB- 建议： 仔细阅读注意事项 4。 *样品冻融超过 1 次- 建议： 尽量使用新鲜样品和冻融不超过 1 次的样品。 *样品在室温放置过久- 建议： 尽快处理样品或者低温适当方式保存。 *裂解不完全，蛋白酶 K 失效了- 建议： 收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。 *结合液 CB 和 Acryl Carrier 没有充分混匀- 建议： 充分涡旋混匀。 *试剂和样品没有充分混匀- 建议： 加入每个试剂后都要充分混匀。 *洗脱效率不高- 建议： 确保做了步骤 9，否则残留乙醇会影响洗脱效率，仔细阅读步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 TE 洗脱。
DNA 的下游反应如 PCR 效果不佳	* DNA 产量低或者洗脱液中无 DNA- 建议： 在下游反应中增加 DNA 用量。 * 洗脱液中太多或者太少的 Acryl Carrier- 建议： 确定在下游应用中 Acryl Carrier 的最大允许量，调整结合液 CB 中加入 Acryl Carrier 的用量。 * 降低的灵敏度- 建议： 确定在下游 PCR 应用中 DNA 洗脱液的最大允许用量，减少或者增加 DNA 洗脱液在 PCR 反应中的用量，DNA 洗脱体积也可以相应的调整。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应- 建议： 确保做了步骤 9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。 *一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应- 建议： 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。