

## 唾液基因组 DNA 快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: ZP321T

### 试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP321T-01 (50 次)
缓冲液 E	1ml
溶菌酶	0.5ml
裂解液 S	5ml
结合液 CB	30 ml
抑制物去除液 IR	25 ml
Acryl Carrier	0.5ml
蛋白酶 K	0.5 ml
漂洗液 W2	15 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml
吸附柱	50 个
收集管 (2ml)	50 个
说明书	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, 特别适合于从唾液中分离纯化基因组 DNA, 包括细菌和口腔上皮 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 55ml 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！

### 对于口腔唾液的 DNA 提取：

1. 涡旋振荡混匀 10 秒，取 400ul 唾液到 1.5ml 离心管中，加入 10ul 缓冲液 E，振荡 5-10s 混匀；

**选做步骤：**如对口腔细菌进行研究可以加入 10ul 溶菌酶，振荡 5-10s 混匀。37°C 温浴酶解 20min。

2. 加入 50ul 的裂解液 S（此试剂 4°C 放置会沉淀，使用时可 37°C 溶解后使用），振荡 5-10s 混匀。再加入 10ul 的蛋白酶 K (10mg/ml) 溶液，**涡旋振荡充分混匀**，56°C 放置 1 小时，期间每 20 分钟涡旋混匀 5-10 秒。

3. 加入 450ul 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70°C 放置 2 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 450ul 结合液 CB 中加入 5-8ul Acryl Carrier。**

4. 冷却后加 450ul 无水乙醇，**涡旋振荡强力混匀 30s**。简短离心以除去管盖内壁的液滴，收集所有的液体到管底。
5. 将上一步混合物加入一个吸附柱中，（吸附柱一次上样量为 700ul，超出的液体可多次上样离心。）12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
6. 加入 500ul 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
7. 加入 500ul 漂洗液 W2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 20 秒，弃掉废液。
8. 加入 500ul 漂洗液 W2，12,000rpm 离心 20 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 - 80ul 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 40ul，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。

洗脱液中无 EDTA，长期保存最好加入终浓度为 1mM 的 EDTA。

## 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	<ul style="list-style-type: none"><li>* Acryl Carrier 没有加入到结合液 CB-<b>建议：</b>仔细阅读注意事项 4。</li><li>* 样品冻融超过 1 次-<b>建议：</b>尽量使用新鲜样品和冻融不超过 1 次的样品。</li><li>* 样品在室温放置过久-<b>建议：</b>尽快处理样品或者低温适当方式保存。</li><li>* 裂解不完全，蛋白酶 K 失效了-<b>建议：</b>收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。</li><li>* 结合液 CB 和 Acryl Carrier 没有充分混匀-<b>建议：</b>充分涡旋混匀。</li><li>* 试剂和样品没有充分混匀-<b>建议：</b>加入每个试剂后都要充分混匀。</li><li>* 洗脱效率不高-<b>建议：</b>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。</li></ul>
DNA 的下游反应如 PCR 效果不佳	<ul style="list-style-type: none"><li>* DNA 产量低或者洗脱液中无 DNA-<b>建议：</b>在下游反应中增加 DNA 用量。</li><li>* 洗脱液中太多或者太少的 Acryl Carrier-<b>建议：</b>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。</li><li>* 降低的灵敏度-<b>建议：</b>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。</li></ul>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<ul style="list-style-type: none"><li>* 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-<b>建议：</b>确保做了步骤 9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。</li><li>* 一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-<b>建议：</b>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。</li></ul>