

# 口拭子基因组 DNA 提取试剂盒（硅胶膜离心柱法）

## 产品组分

组分	N1201	N1202
消化缓冲液 DS	30 ml	60 ml
裂解液 MS	30 ml	60 ml
蛋白酶 K	1 ml	2 ml
去蛋白液 PS	30 ml	60 ml
漂洗液 PE	15 ml	30 ml
纯化液 TE	5 ml	10 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

- 裂解液 MS 中含变性剂，请不要直接接触皮肤。
- 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 3 稀释，即含 75%乙醇。

## 产品说明

本产品用于口腔拭子基因组 DNA 的纯化。其纯化原理是利用细胞裂解液裂解细胞核释放基因组 DNA，由硅胶膜柱可逆吸附基因组 DNA，经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质后，用纯化液洗脱获得基因组 DNA。本产品可从口拭子中提取到 0.5-5  $\mu\text{g}$  高纯度基因组 DNA

( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.7-1.9$ )，此基因组 DNA 可直接用于 PCR、酶切、文库构建等后续实验。

## 质量控制

纯化的基因组 DNA 质量通过限制性酶切和单拷贝基因的 PCR 扩增鉴定。

## 保存条件

蛋白酶 K 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

其余试剂置于室温 ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) 干燥条件下保存 1 年。

如果消化缓冲液 DS 和裂解液 MS 中有沉淀，可在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解，待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 的纯化效率。

## 注意事项

- 漂洗液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入 3 倍体积的无水乙醇，即 15 ml 漂洗液 PE 加入 45 ml 无水乙醇，30 ml 漂洗液 PE 加入 90 ml 无水乙醇，使用后立即盖紧盖子。
- 消化缓冲液 DS 和裂解液 MS 室温保存可能会有沉淀产生，在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解，待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 纯化效率。
- 应尽量使用新鲜的实验材料，确保提取的基因组 DNA 不被降解。不能立刻提取基因组 DNA 的实验材料应尽快置于液氮或  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存并避免反复冻融。
- 基因组 DNA 需长期保存时，建议使用纯化液 TE。用无菌的离心管分装后保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$ 。
- 所有离心步骤均为室温下进行。
- 请严格按照操作步骤操作。

**操作步骤**

- 1 取样: 将医用棉签在面颊内侧擦拭 15 次即可。(为保证样本不被食物等污染, 取样前请用纯净水漱口, 30min 内勿进食和饮水。)
- 2 处理材料: 将擦拭过的棉签置于 2ml 离心管中, 加入 400  $\mu$ l 消化缓冲液 DS, 剪断棉签杆部, 留棉签部分在缓冲液中, 漩涡振荡 1min, 用镊子取出棉签并尽量挤出其中的液体。
  - 如需去除 RNA, 可加入 4  $\mu$ l RNase A (100 mg/ml), 振荡 15 秒, 室温放置 5min。
- 3 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K, 振荡 15s 混匀, 55 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴 1 小时。期间每 15 分钟颠倒混匀一次。
- 4 加入 400  $\mu$ l 裂解液 MS, 漩涡振荡混匀。65 $^{\circ}$ C 温浴 10min, 溶液应变清亮, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。
  - 加入裂解液 MS 时可能会产生白色沉淀, 一般 65 $^{\circ}$ C 放置时会消失, 不会影响后续实验。如溶液未变清亮, 说明细胞裂解不彻底, 可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。
- 5 加入 400 $\mu$ l 无水乙醇, 上下颠倒混匀, 此时可能出现絮状沉淀, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。
- 6 将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中 (如果一次转不完, 可分为两次, 纯化柱最大上样量为 800 $\mu$ l)。12,000rpm 离心 1min, 弃滤液。
  - 此时基因组 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。
- 7 向纯化柱加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 PS, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
  - 此步骤的作用是去除硅胶膜上吸附的蛋白、脂质等杂质, 以获得高质量基因组 DNA。
- 8 向纯化柱加入 500 $\mu$ l 漂洗液 PE, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
  - 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 3 稀释, 即含 75%乙醇。
- 9 向纯化柱加入 500  $\mu$ l 漂洗液 PE, 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
- 10 12,000 rpm 离心 3min, 以彻底去除纯化柱中残留的液体。
  - 此步骤的作用是去除残留乙醇, 避免影响后续的酶促反应 (PCR 或酶切)。同时利于基因组 DNA 充分溶解。
- 11 将纯化柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱中央处, 悬空滴加 20-50 $\mu$ l 洗脱液 TE, 室温放置 2min。
- 12 12,000 rpm 离心 2min, 管底即为高纯度基因组 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。
  - 洗脱液体积不应低于 20 $\mu$ l, 过小会影响回收效率。
  - 洗脱液 TE 可用去离子水代替, 但其 pH 需为 8.0-8.5。
  - 对洗脱液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热, 会提高基因组 DNA 的产量。
  - 为增加 DNA 得率, 可将离心收集的洗脱液重新加入纯化柱, 室温放置 2min, 12,000 rpm 离心 2min。