



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 口腔/咽拭子基因组DNA快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1430
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 1430

目录编号	包装单位
143001	50次

❖ **适用范围:**

适合于从口腔/咽拭子中分离纯化基因组DNA。

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50次
裂解液 ML	室温	20 ml
结合液 CB	室温	20 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
Carrier RNA	-20℃	310 µg
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
蛋白酶 K 粉 (可选) 20mg/ml	-20℃	20 mg
吸附柱 AC 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果

储存事项:

1. 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℃ 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 为避免降低活性，方便运输，提供**蛋白酶 K 为冻干粉状**，收到后，可短暂离心后，加入 **1 毫升灭菌水溶解**。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存，-20℃ 保存。
3. **Carrier RNA 收到时为冻干粉状，使用前按照注意事项 4 配制和储存。**
4. 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盖子。

❖ **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 Carrier RNA 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 Carrier RNA 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. **Carrier RNA :**
 - 1) Carrier RNA 收到时为冻干状，使用时加入 310 μ l RNase free 水充分溶解，配制成 1 μ g/ μ l 溶液。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 $^{\circ}$ C 储存。
 - 2) **Carrier RNA 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 Carrier RNA，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 1 μ l Carrier RNA 储存溶液，将结合液 CB 与 Carrier RNA 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) **Carrier RNA 加入过多造成 DNA 洗脱液中 Carrier RNA 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。**

❖ **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 WB 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（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. 用剪刀将棉签部分从其杆上剪下，放入 2ml 离心管中，加入 400 μ l 裂解液 ML。
2. 再加入 20 μ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，**立刻涡旋振荡充分混匀**，56 $^{\circ}$ C 放置 1 小时，期间每 10 分钟涡旋混匀 10 秒。
3. 加入 400 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70 $^{\circ}$ 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 400 μ l 结合液 CB 中加入 1 μ l Carrier RNA 储存溶液。

4. 冷却后加 200 μ l 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 $^{\circ}$ C,乙醇需要冰上预冷后再加入。

5. 将上一步混合物加入一个吸附柱 AC 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。

棉签的棉花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 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
7. 加入 500 μ l 漂洗液 WB（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 500 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 将吸附柱 AC 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 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 20–50 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ 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 20 μ l，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 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 $^{\circ}$ 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	<ul style="list-style-type: none">*Carrier RNA 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 Carrier RNA 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 EB 洗脱。
DNA 的下游反应如 PCR 效果不佳	<ul style="list-style-type: none">* 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 Carrier RNA-建议：确定在下游应用中 Carrier RNA 的最大允许量，调整结合液 CB 中加入 Carrier RNA 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	<ul style="list-style-type: none">*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。