



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 口腔/咽拭子基因组DNA快速提取试剂盒
  - ◆ 目录号 DN30
  - ◆ 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: DN30

目录编号	包装单位
DN3001	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
平衡液	室温	5 ml
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	13 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Poly Carrier	-20℃	200µl
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
蛋白酶 K 溶液 20mg/ml	-20℃	1ml
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. **蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中**, 常温运输。收到后, 不超过 25℃ 室温至少保存 6 个月, 4℃ 保存 12 个月, -20℃ 保存 2 年。
3. 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 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜(特别配备了 Poly 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。典型产量 0.5μg-3.5μg/拭子。

❖ **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 Poly 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. **Poly Carrier:**

**Poly 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Poly 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PolyCarrier。使用时在每个样品提取所需400 $\mu$ l结合液CB 中加入4 $\mu$ l Poly Carrier，将结合液CB 与Poly 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Poly Carrier混匀备用。混合液在室温24小时内稳定。

❖ **关于平衡液的使用**

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37 $^{\circ}$ C使沉淀完全消失。
2. **使用方法：**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 $\mu$ l 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

---

❖ **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！

1. 样本采集：

1) 口咽拭子样本处理方式：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。用剪刀将棉签部分从其杆上剪下，放入 2 mL 离心管中，加入 400  $\mu$ l 裂解液 ML。

**注：**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 min 内应该避免进食或者饮水。**

2) 鼻咽拭子样本处理方式：将在咽部擦拭过的拭子转移到 5 ml 离心管中，加入 1 ml-2 ml 的裂解液 ML，涡旋振荡混匀。取出 400  $\mu$ l 的样品，用于后续提取。

3) 唾液样本处理方式：按照要求取唾液并转移至 5 ml 离心管中，加入等体积的裂解液 ML，涡旋振荡混匀。取出 400  $\mu$ l 的样品，用于后续提取。

4) 保存在拭子保存液中的拭子处理方式：在拭子保存液中加入 1/5 体积的裂解液 ML。取出 400  $\mu$ l 的样品，用于后续提取。

2. 再加入 20 $\mu$ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，**立刻涡旋振荡充分混匀**，

3. 可选步骤（一般不需要做）：56 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟，期间每 10 分钟涡旋混匀 10 秒。

**一般情况下该步骤可以省略，除非效果不好，再尝试加做此步骤。**

4. 加入 400 $\mu$ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。此时溶液应变清亮。

**如果拭子上细胞数量少，导致提取的基因组 DNA 产量低于 1 $\mu$ g，可以在 400 $\mu$ l**

---

**结合液 CB 中加入 4μl Poly Carrier 。**

**平衡液预处理吸附柱备用：**

**使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”**

5. 冷却后加 200μl 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℃,乙醇需要冰上预冷后再加入。**

6. 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）12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
7. 加入 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
8. 加入 600μl 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。
9. 加入 600μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 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。
11. 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 20-50μl 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。收集滤液，即为 DNA 溶液。

**洗注：可通过以下方式提高回收产量：①70℃预热洗脱液；②将 DNA 滤液再次上柱，室温放置 2 min 后，洗脱。**

12. DNA 可以短暂存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在 -20℃。

---

❖ 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>* Poly 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 Poly 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 10, 否则残留乙醇会影响洗脱效率, 仔细阅读步骤 11 和只使用洗脱缓冲液 EB 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>* 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 10, 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 12,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</li></ul>