

7. 向微量吸附柱中加入 700µl 漂洗液 WB (使用前请先检查是否加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将微量吸附柱放回收集管。
8. 向微量吸附柱中加入 500µl 漂洗液 WB, 12000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液。
9. 将微量吸附柱放回收集管中, 12000rpm 离心 2 分钟, 倒掉废液。将微量吸附柱室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
注意: 这一步的目的是将微量吸附柱中残余的漂洗液去除, 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切等) 实验。
10. 将微量吸附柱转入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 20-50µl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液 EB 事先在 65-70°C 预热), 室温放置 2-5 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟。

注意: 洗脱缓冲液体积不应少于 20ul, 体积过小影响回收效率。

为增加基因组的得率, 可将离心得到的溶液再加入微量吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 PH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用将水的值调到此范围), PH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保持在 -20°C, 以防 DNA 降解。

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (DP7001)	100 次 (DP7002)
缓冲液 VB	室温	30 ml	60 ml
结合液 CB	室温	30 ml	60 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml	50 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25 ml
		<i>第一次使用前请加入指定量乙醇</i>	
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	15 ml
蛋白酶 K	-20°C	20mg 冻干粉	2x20mg 冻干粉
微量吸附柱	室温	50	100 个
收集管 (2ml)	室温	50	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意:

1. 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量乙醇, 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!
2. 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°C 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。
3. 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 400 微升或者 1 毫升灭菌水溶解 (20mg/ml 终浓度)。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 (20 微升) 分装冻存, -20°C 保存。
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。

二、原理简介

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶,然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

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. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度, 无抑制性杂质。
4. 本试剂盒用于从新鲜或者冷冻口腔拭子中提取基因组 DNA。所得样品可以直接用于 PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。
5. 提取得率: 每个口腔拭子 0.5-3.5 μ g。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13, 000 rpm 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 70 $^{\circ}$ C 备用。
3. 为了保证样本不被食物或饮料污染, 取样前 30 分钟内请勿进食和饮水。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇!

1. 处理材料: 将在面颊内擦拭过的棉签用剪刀将棉签部分从其杆上剪下(尽量剪细), 转置于 2ml 离心管中, 加入 400 μ l 缓冲液 VB。

注意: 如果需要去除 RNA, 可加入 4 μ l RNaseA (10mg/ml) 溶液 (客户自备, 目录号: sp1001), 振荡 15 秒, 室温放置 5 分钟。

2. 加入 20 μ l 蛋白酶 K 溶液, 涡旋 10 秒混匀, 65 $^{\circ}$ C 放置 25 分钟, 其间每 2 分钟涡旋混匀数次。
3. 加入 400 μ l 结合液 CB, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟, 此时溶液应变清亮, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。

注意 1: 加入缓冲液时可能会产生白色沉淀, 一般 70 $^{\circ}$ 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, 可能导致提取量少和提取出的不纯。

注意 2: 如果由于拭子上细胞数少导致提取的基因组少于 1 μ g, 可以在添加结合液 CB 的同时添加 10 μ l Carrier(自备)。

4. 加 200 μ l 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。
注意: 加入无水乙醇后可能会出现絮状沉淀, 但不影响 DNA 提取。
5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀 (连同棉签) 都加入一个微量吸附柱中 (微量吸附柱放入收集管中), 12000rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将微量吸附柱放回收集管中。
6. 向微量吸附柱中加入 500 μ l 抑制物去除液 IR, 12000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将微量吸附柱放入收集管中。