

AipBest 口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)
AipBest Oral/Pharyngeal Swab Genomic DNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆目录号：OD209

目录编号	包装单位
OD209-01	50次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(OD209-01)
平衡液	室温	5mL
裂解液 ML	室温	20mL
结合液 CB	室温	20mL
抑制物去除液 IR	室温	25mL
漂洗液 WB	室温	13mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Poly Carrier	-20°C	200μL
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL
蛋白酶 K 溶液 20mg/mL	-20°C	1mL
吸附柱 AC 和收集管	室温	50 套

◆适用范围：适合于从口腔/咽拭子中分离纯化基因组 DNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

- 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。
- 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°C 室温至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，-20°C 保存 2 年。
- 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. 操作安全, 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, 快速简捷, 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 杂交等实验。

◆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 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 400µL 结合液 CB 中加入 4µL 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°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 100µL 的平衡液至柱子中。13000rpm 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 2mL 离心管中, 加入 400 μ 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 5mL 离心管中, 加入 1mL-2mL 的裂解液 ML, 涡旋振荡混匀。取出 400 μ 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 5mL 离心管中, 加入等体积的裂解液 ML, 涡旋振荡混匀。取出 400 μ 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 μ L 的样品, 用于后续提取。

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。

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。

注: 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 μ 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。

注: 如果拭子上细胞数量少, 导致提取的基因组 DNA 产量过低于 1 μ g, 可以在 400 μ L 结合液 CB 中加入 4 μ L 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 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。

注: 如果周围环境高于 25 $^{\circ}$ C, 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 500 μ L 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。

8. 加入 600 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。

9. 加入 600 μ L 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 20-50 μ L 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。

注: 可通过以下方式提高回收产量: ①70 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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	<p>*Poly Carrier 没有加入到结合液 CB-建议:仔细阅读注意事项 4。</p> <p>*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。</p> <p>*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。</p> <p>*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。</p> <p>*结合液 CB 和 Poly Carrier 没有充分混匀-建议:充分涡旋混匀。</p> <p>*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。</p> <p>*洗脱效率不高-建议: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。</p>
DNA 的下游反应如 PCR 效果不佳	<p>*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。</p> <p>*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。</p>
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*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 10, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。</p> <p>*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 12,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p>



扫码关注我们