

## 痰液 DNA 试剂盒说明书

### 产品组成

痰液 DNA 试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	3502005	3502050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 收集管	5 个	50 个
Buffer SP	100 $\mu$ l	1 ml
蛋白酶 K 贮存液	120 $\mu$ l	1.2 ml
Buffer DT	10 ml	50 ml $\times$ 2
Buffer SD (浓缩液)	6 ml	60 ml
Buffer WD (浓缩液)	1 ml	10 ml
Buffer WB (浓缩液)	1.5 ml	9.5 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml
说明书	1 份	1 份

### 产品储存与有效期

蛋白酶 K 贮存液和 Buffer SP 请于 -20 $^{\circ}$ C 储存，其他试剂与物品储存于常温 (0~30 $^{\circ}$ C)，可在两年内保持使用性能无明显变化。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本产品适合从 1 ml 液化的痰液中分离纯化总 DNA (包括基因组 DNA、线粒体 DNA 及可能存在的细菌、病毒 DNA)。被溶解的痰液经蛋白酶 K 消化后 DNA 将结合到硅胶颗粒和纯化柱上，降解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WB 和无水乙醇洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管，15 ml 离心管和移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管、2 ml 离心管和 15 ml 离心管的转子)
5. 恒温摇床、水浴锅 (干浴锅) 和旋涡振荡器

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
2. 将恒温摇床温度设置到 37 $^{\circ}$ C；水浴锅温度设置到 60 $^{\circ}$ C，将 Buffer TE 温育至 60 $^{\circ}$ C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer SD、Buffer WD 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。

## 操作步骤：

1. 估算痰液的体积，按痰液的 1~1.5 倍体积加入 Buffer DT，再加入 15  $\mu$ l Buffer SP，摇床 37°C 振荡 0.5~2 小时，使痰液充分液化。

\* 振荡时间可根据痰液的粘稠度相应减少或增加。

2. 吸取 1 ml 液化的痰液加入到 15 ml 离心管中。用力摇晃装有 Buffer SD 的试剂瓶，使溶液中的硅胶颗粒充分悬浮起来，吸取 2 ml Buffer SD 加入到同一个 15 ml 离心管中，盖上管盖，旋涡振荡 15 秒混合均匀。

\* 如果液化后的痰液呈胶冻状（通常是黄褐色的浓痰液化后的状态，用 1 ml 吸头吸取时会有较大阻力，呈现很难吸取的状态），则应改为吸取 0.3~0.5 ml 液化的痰液加入到 15 ml 离心管中，并补加 Buffer DT 使液化的痰液稀释至 1 ml，后续操作步骤不变。

\* 如果使用了过量呈胶冻状液化的痰液，可能会超出后续蛋白酶 K 的消化能力，并且过量释放的 DNA 会使硅胶颗粒凝集成絮状物，导致最终 DNA 的回收效率降低，纯度变差。

\* 确认在 Buffer SD 中已经加入无水乙醇。

\* Buffer SD 中的硅胶颗粒必须充分悬浮并被加入到痰液中，否则将影响后续检测的灵敏度。

3. 2000 rpm 离心 5 分钟。吸弃 2.7 ml 上清，保留硅胶颗粒沉淀和部分上清。

4. 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，盖上管盖，旋涡振荡 15 秒混合均匀。60°C 水浴 20 分钟。

5. 加入 300  $\mu$ l Buffer WD，用移液器吸头吸注数次混合均匀。

\* 确认在 Buffer WD 中已经加入无水乙醇。

6. 吸取步骤 5 中的混合液（包括硅胶颗粒）加入到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 硅胶颗粒中吸附有 DNA，必须全部转入到核酸纯化柱中。

\* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 700  $\mu$ l 无水乙醇，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

9. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

10. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 100~200  $\mu$ l 60°C 温育的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

\* 粘稠的浓痰中 DNA 含量很高，如果是浓痰样本，请至少用 200  $\mu$ l Buffer TE 洗脱 DNA，否则 DNA 浓度太高可能影响后续 DNA 的定量及检测。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

\* 如果洗脱的 DNA 中含有少量硅胶颗粒，弃纯化柱后盖上离心管管盖，最高速离心 1 分钟，吸取 DNA 上清直接使用；或者将 DNA 上清转移到另一个洁净的 1.5 ml 离心管中储存于 -20°C 备用。