

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 离心管	5 个	50 个
Buffer SP	100 μ l	1 ml
蛋白酶 K 贮存液	120 μ l	1.2 ml
Buffer DT	10 ml	50 ml \times 2
Buffer SD (浓缩液)	6 ml	60 ml
Buffer WN (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

1. 蛋白酶 K 贮存液和 Buffer SP 请于 - 20 $^{\circ}$ C 储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30 $^{\circ}$ C)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8 $^{\circ}$ C，可延长产品的有效期至两年以上 (2~8 $^{\circ}$ C 储存的产品使用前应先恢复到室温后再使用)。

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 WN 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 μ l Buffer SP，摇床37 $^{\circ}$ 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和增加。

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，加入2 ml Buffer SD，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1ml。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上清液，保留硅胶颗粒沉淀和部分上清液。

4. 加入20 μ l蛋白酶K贮存液，旋涡振荡15秒混合均匀。60 $^{\circ}$ C水浴20分钟。

5. 加入300 μ l Buffer WN，用移液器吸头吸注数次混合均匀。

* 确认在Buffer WN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离心管中）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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ 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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入700 μ l无水乙醇，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

9. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，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离心管，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 μ l 60 $^{\circ}$ 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 μ 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 $^{\circ}$ 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离心管中存储于-20 $^{\circ}$ C备用。