

96 痕量 DNA 提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒专门为从痕量细胞、体液和组织中提取 DNA 而设计, 适合处理的样品为 5×10^4 - 5×10^6 细胞、1-50 μ l 唾液或痰液、干燥的唾液 (介质包括香烟过滤嘴、滤纸、纸巾、衣物等)、口拭子、1-10 mg 组织 (包括石蜡包埋组织或切片、福尔马林或酒精浸泡的组织)、毛囊、指甲、皮屑和精斑等。

方法简单、方便: 优化的裂解液配合蛋白酶 K 最大程度释放 DNA, 调结合条件(无需添加 Carrier RNA), 释放的 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上, 漂洗去除抑制物和盐, 低盐溶液洗脱 DNA。获得的 DNA 可直接用于 PCR、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。石蜡包埋组织无需事先脱蜡。

本试剂盒使用 96 DNA 吸附板-T10 回收 DNA, 完全避免个别孔可能被堵塞的情况, 确保样品提取的均一性, 最小洗脱体积为 25 μ l, 最大洗脱总体积为 140 μ l。

处理部分样品需单独订购 96 过滤板-N: 干燥于滤纸、纸巾、衣物等介质的唾液, 各种组织、毛囊、指甲和皮屑等。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK803-96-2	原理与用途
Proteinase K*	1 ml \times 4	降解蛋白
Buffer SD1	120 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer SD2	60 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WDS	120 ml	洗涤去除蛋白和抑制物
Buffer WAF	120 ml	洗涤去除蛋白和抑制物
Buffer WB2 [§]	65 ml	洗涤去除盐
96 DNA 吸附板-T10	2 块	选择性吸附 DNA
96 深孔板 (2.2 ml)	8 块	接收废液
96 U 型板	2 块	接收洗脱的 DNA
不干胶片	8 张	密封 96 孔板
TE*	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	

* Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

§ Buffer WB2: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

※ TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% Na₃N, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

三、注意事项

1. Buffer SD1、Buffer SD2、Buffer WDS 和 Buffer WAF 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果, 尤其是 Buffer WAF 和添加了乙醇的 Buffer WB2。

四、实验准备

1. 65°C 水浴或温箱; 65°C 预热 TE 或去离子水 (pH \geq 7)。
2. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇, 混合均匀。
3. 每次使用前, 检查 Buffer SD1 是否析出沉淀物, 如有沉淀物在 65°C 放置数分钟, 沉淀溶解后使用。

五、操作流程示意图

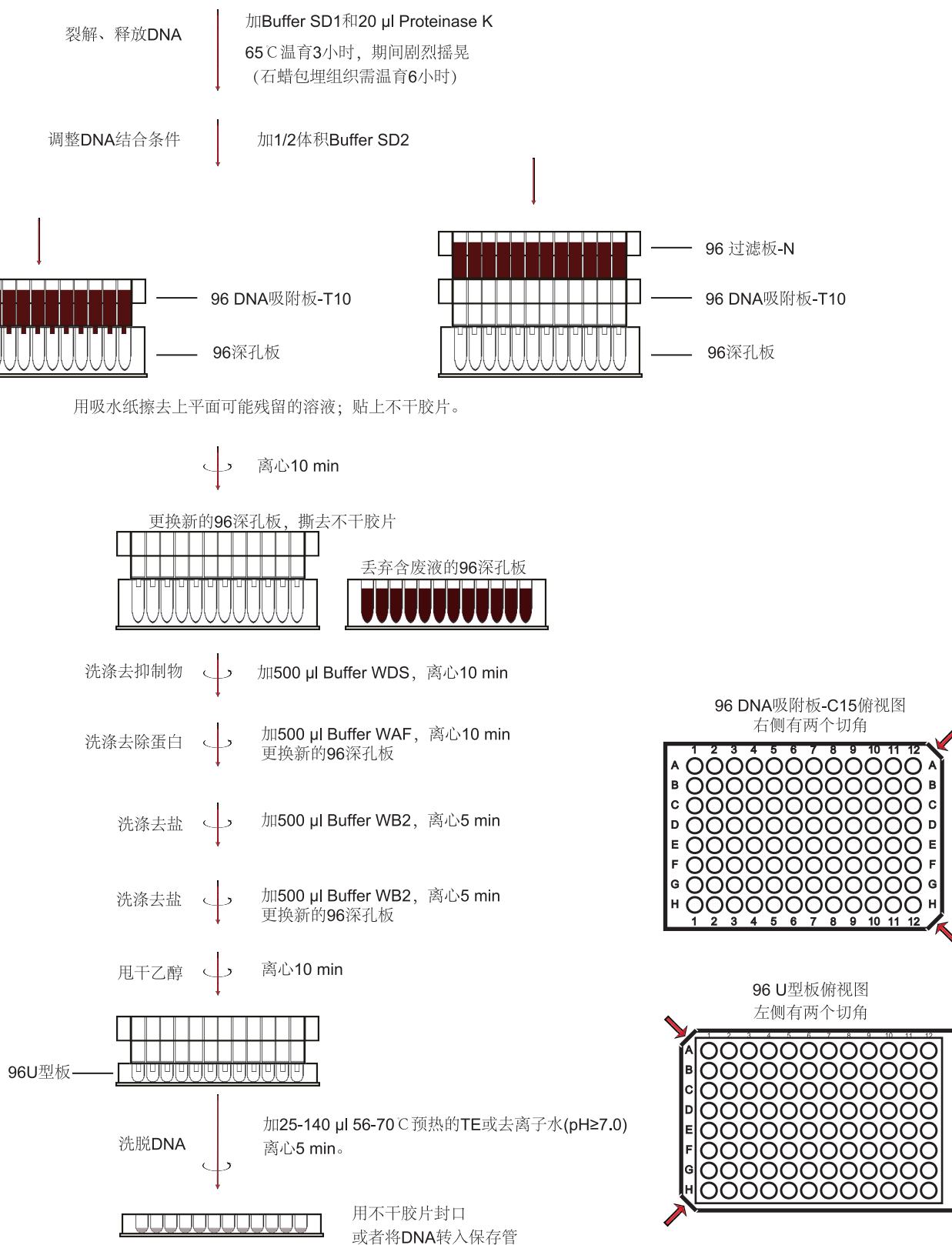
A. 5×10^4 - 5×10^6 细胞、1-50 μ l 唾液或痰液

B. 口拭子、香烟过滤嘴（近嘴端 2-6 mm）

C. 滤纸、纸巾、衣物上干燥的唾液或痰液

D. 1-10 mg 组织、毛囊、指甲、皮屑、福尔马林或酒精浸泡的组织

E. 石蜡包埋组织或切片



六、操作步骤

所有离心条件为：吊篮式水平转子，室温 $2,500\times g$ ；如果离心力偏低，不利于溶液滤过，最终获得的 DNA 有明显的蛋白、盐和乙醇残留；如果

离心力偏高，塑料耗材可能会变形甚至破裂。计速为 rpm 的离心机，按公式计算所需转速：

$$\text{转速(rpm)} = \frac{15007}{\sqrt{R}} \quad R \text{ 为转子半径, 单位 cm.}$$

如果吊篮式水平转子底部不平整，应在底部垫上合适尺寸、平整的铁板或者塑料板。

1. 样品裂解

! 温育时间较长，延长温育时间不影响使用效果，请合理安排时间，批量处理样品建议温育过夜；

A. 5×10^4 - 5×10^6 细胞、1-50 μl 唾液或痰液

加入 20 μl Proteinase K 和 500 μl Buffer SD1，用力摇晃 20 次，置于 65°C 水浴或温箱 3 小时，期间至少摇晃混合 2 次。

B. 口拭子、香烟过滤嘴（近嘴端 2-6 mm）

将样品置于 2 ml 离心管，加入 20 μl Proteinase K 和 800 μl Buffer SD1，用力摇晃 20 次，置于 65°C 水浴或温箱 3 小时，期间至少摇晃混合 2 次。

可根据实际情况调整 Buffer SD1 用量，保证介质完全浸没在 Buffer SD1 中，步骤 2 应按比例调整试剂用量：Buffer SD1/ Buffer SD2= 2/ 1。

C. 滤纸、纸巾、衣物上干燥的唾液或痰液

剪取含唾液或痰液的介质置于 2 ml 离心管中，加入 20 μl Proteinase K 和 800 μl Buffer SD1，用力摇晃 20 次，置于 65°C 水浴或温箱 3 小时，期间至少摇晃混合 2 次；

可根据实际情况调整 Buffer SD1 用量，保证介质完全浸没在 Buffer SD1 中，步骤 C3 应按比例调整试剂用量：Buffer SD1/ Buffer SD2= 2/ 1。

D. 1-10 mg 组织、毛囊、指甲、皮屑、福尔马林或酒精浸泡的组织

称取 1-10 mg 福尔马林或酒精浸泡的组织转入 1.5ml 离心管，用生理盐水、去离子水或 TE 洗涤 2 次，仔细吸除洗涤液；

称取 1-10 mg 正常组织、1-3 个毛囊、指甲、皮屑等置于 1.5 ml 离心管中；

加入 20 μl Proteinase K 和 500 μl Buffer SD1，用力摇晃 20 次，置于 65°C 水浴或温箱 3 小时，期间至少摇晃混合 2 次。

E. 石蜡包埋组织或切片

加入 20 μl Proteinase K 和 500 μl Buffer SD1，置于 65°C 水浴或温箱 10-15 min，此时石蜡已融化，用力摇晃离心管 20 次；

石蜡切片继续温育 3 小时，期间至少摇晃混合 2 次；

块状石蜡包埋组织继续温育 6 小时，期间至少摇晃混合 2 次。

2. 耗材组装

样品种类 A 和 B：将 96 DNA 吸附板-T10 置 96 深孔板 上；

样品种类 C、D 和 E：从下到上为 96 深孔板---96 DNA 吸附板-T10---96 过滤板-N（! 请注意编号方向）。

3. 调整结合条件

Buffer SD2 用量为 1/2 Buffer SD1 体积。

加入 Buffer SD2，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，按编号顺序将溶液转入步骤 2 准备的 96 DNA 吸附板-T10 或 96 过滤板-N。

如使用 96 过滤板-N，溶液完全滤过后丢弃 96 过滤板-N。

如果 96 DNA 吸附板-T10 上平面沾染溶液，用干净的吸水纸擦干，贴上不干胶片。

! 加入 Buffer SD2 后混合方式应温和，避免产生大量气泡；转入 96 孔板前请勿离心，包括简短离心。

! 转移溶液时避免交叉污染。

4. 将 96 DNA 吸附板-T10 连同 96 深孔板 放入吊篮式水平转子，离心 10 min；将 96 DNA 吸附板-T10 转入另外一块干净的 96 深孔板，撕去不干胶片。
5. 每孔加入 500 μ l Buffer WDS，离心 10 min。
6. 每孔加入 500 μ l Buffer WAF，离心 10 min；将 96 DNA 吸附板-T10 转入另外一块干净的 96 深孔板。
7. 每孔加入 500 μ l Buffer WB2，离心 5 min。
8. 每孔加入 500 μ l Buffer WB2，离心 5 min；将 96 DNA 吸附板-T10 转入另外一块干净的 96 深孔板。
9. 离心 10 min。
10. 将 96 DNA 吸附板-T10 按照编号方向转入 96 U 型板，每孔加入 25-140 μ l 56-70 $^{\circ}$ C 预热的 TE 或去离子水(pH \geq 7.0)，离心 5 min。

加入洗脱液体积为 25-100 μ l，需将洗脱液准确加在硅胶膜中央；加入洗脱液体积为 100-140 μ l，无需注意加样的位置。

56-70 $^{\circ}$ C 预热 TE 或者去离子水(pH \geq 7.0)，可以提高洗脱效率。

如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 \geq 7.0。

再次加入 \geq 25 μ l TE 或去离子水洗脱，可以提高洗脱效率。但洗脱总体积不可超过 140 μ l，不然 96 DNA 吸附板-T10 底部会接触液面。