

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。

本试剂盒使用的 DNA 吸附柱-T15 回收 DNA, 最小洗脱体积为 20 μ l, 能有效回收 ≥ 250 bp 的 DNA 片段。

石蜡包埋组织/切片无需脱蜡, 避免使用二甲苯、乙醚等有机试剂, 需单独订购过滤柱-F(Cat#NC412), 用于去除石蜡。

如唾液或痰液分布于滤纸或纸巾等介质, 后者在水溶液中易分散而无法离心去除, 需单独订购过滤柱-F。

相关产品: 痕量血液 DNA 提取试剂盒 (DK801), 适合从 1-50 μ l 血液或干血点中提取 DNA;

样品采集卡 DNA 提取试剂盒 (DK804), 适合从 Whatman Indicating FTA Card 采集的唾液和血液中提取 DNA。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK803-01 (50 次)	DK803-02 (200 次)	原理与用途
Proteinase K*	1 ml	4 \times 1 ml	降解蛋白
Buffer SD1	30 ml	120 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer SD2	15 ml	60 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WDS	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白和抑制物
Buffer WAF	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白和抑制物
Buffer WB2 [§]	16 ml	65 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-T15	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	2 \times 50 个	2 \times 200 个	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个	接收洗脱的 DNA
TE*	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或晶状不溶物, 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, pH 8.0(25°C)。

所有组成成分于室温储存。

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 ≥ 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、操作步骤

如未注明，所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000-16,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

1. 样品裂解与调整结合条件

请根据样品种类选择方法 A-E，C 和 E 需单独订购过滤柱-F；

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；

加入 Buffer SD2 后混合方式应温和，避免产生大量气泡；转入 DNA 吸附柱前请勿离心，包括简短离心。

A. 5×10^4 - 5×10^6 细胞、1-50 μ l 唾液或痰液

A1. 加入 **20 μ l Proteinase K** 和 **500 μ l Buffer SD1**，用力摇晃 20 次，置于 65℃ 水浴或温箱 3 小时，温育期间至少摇晃混合 2 次；

A2. 加入 **250 μ l Buffer SD2**，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，将溶液转入 DNA 吸附柱-T15；继续操作步骤 2；

B. 口拭子、香烟过滤嘴（近嘴端 2-6 mm）

B1. 加入 **20 μ l Proteinase K** 和 **800 μ l Buffer SD1**，用力摇晃 20 次，置于 65℃ 水浴或温箱 3 小时，温育期间至少摇晃混合 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 B2 应按比例调整试剂用量：Buffer SD1/ Buffer SD2= 2/ 1。

B2. 加入 **400 μ l Buffer SD2**，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，吸取 $\leq 800 \mu$ l 溶液转入 DNA 吸附柱-T15；继续操作步骤 2；

C. 滤纸、纸巾、衣物上干燥的唾液或痰液

C1. 剪取含唾液或痰液的介质置于 2 ml 离心管中，加入 **20 μ l Proteinase K** 和 **500 μ l Buffer SD1**，用力摇晃 20 次，置于 65℃ 水浴或温箱 3 小时，温育期间至少摇晃混合 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。

C2. 将溶液与介质转入过滤柱-F(置于 2 ml 离心管)，1,000-2,000×g 离心 10 秒，丢弃过滤柱-F；

C3. 在滤液中加入 **250 μ l Buffer SD2**，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，将溶液转入 DNA 吸附柱-T15；继续操作步骤 2；

如增加 Buffer SD1 用量需分两次将溶液转入 DNA 吸附柱，每次转移溶液最大体积为 750 μ l；

D. 1-10 mg 组织、毛囊、指甲、皮屑、福尔马林或酒精浸泡的组织

D1. 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；

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，继续 D2；

D2. 加入 **20 μ l Proteinase K** 和 **500 μ l Buffer SD1**，用力摇晃 20 次，置于 65℃ 水浴或温箱 3 小时，温育期间至少摇晃混合 2 次；

D3. 离心 1 min，仔细吸取离心上清转入干净的离心管中；

D4. 加入 **250 μ l Buffer SD2**，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，将溶液转入 DNA 吸附柱-T15；继续操作步骤 2；

E. 石蜡包埋组织或切片

E1. 加入 **20 μ l Proteinase K** 和 **500 μ l Buffer SD1**，置于 65℃ 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，温育期间至少摇晃混合 2 次；

块状石蜡包埋组织继续温育 6 小时，温育期间至少摇晃混合 2 次；

E2. 迅速将溶液倒入过滤柱-F(置于 2 ml 离心管)，室温放置 1 min，1,000-2,000×g 离心 10 秒，丢弃过滤柱-F；

请勿使用枪头吸取溶液，石蜡易析出可能会堵塞枪头；

样品从温育条件取出后需及时倒入过滤柱-F，不然溶液表面会析出石蜡层，需使用枪头挑破石蜡层再转移溶液；

E3. 在滤液中加入 **250 μ l Buffer SD2**，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，将溶液转入 DNA 吸附柱-T15；继续操作步骤 2；

2. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-T15 转入另一个干净的收集管中。

3. 加入 **500 μ l Buffer WDS**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-T15 放回收集管中。

4. 加入 **500 μ l Buffer WAF**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-T15 放回收集管中。

5. 加入 **700 μ l Buffer WB2**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-T15 放回收集管中。

6. 加入 **100 μ l Buffer WB2**，离心 2 min。

7. 将 DNA 吸附柱-T15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 $\geq 20 \mu$ l TE 或去离子水(pH \geq 7.0)，室温放置 5 min，离心 1 min。

▲ 加入洗脱液后需放置时间较长，延长放置时间不影响洗脱效率。

▲ 65℃ 预热 TE 或去离子水(pH \geq 7.0)，可以提高洗脱效率。