

Just-a-Plate™ 96 孔板唾液 gDNA 提纯试剂盒

室温保存，Proteinase K 和 RNase A 保存在 4 °C。

试剂盒组成及贮存

Just-a-Plate™ 96 孔板唾液 gDNA 提纯试剂盒可从 Charm Biotech 或 Oragene 公司唾液保存液中提纯 gDNA，其组成如下表所示。所有的组分除了 Proteinase K 和 RNase A 需要保存在 4 °C 之外，其余组分室温保存即可。可进行 1 × 96 或者 10 × 96 次 gDNA 的提纯。

Product Cat. #	PG-870-1	PG-870-10
Purification Scale	1 × 96	10 × 96
96 Deep-well Lysis Plate (LP7)	1 plate	10 plates
96 Deep-well Binding Plate (PB5)	1 plate	10 plates
Binding Buffer (KB6)	22.0 ml	220 ml
Washing Buffer (WB1)	40.0 ml	400 ml
Washing Buffer (WB2)	100.0 ml	1000 ml
Elution Buffer (EB2)	12.0 ml	120 ml
Proteinase K (PK2) (20 mg/ml)	2.0 ml	2.0 ml × 10
RNase A (RA2) (20 mg/ml)	2.0 ml	2.0 ml × 10

产品介绍

Just-a-Plate™ 96 孔板唾液 gDNA 提纯试剂盒可从 Charm Biotech 或 Oragene 公司唾液保存液中简单、快速和高通量地提纯唾液中的 gDNA。在不到两小时的时间内，在一个 96 深孔板中可同时处理 96 个 DNA 样品。昌美生物科技有限公司将固体表面可逆结合技术（SSRB）应用到 Just-a-Plate 系统中，96 孔底部涂有可与唾液裂解液中 gDNA 选择性高效结合的结合剂。在结合缓冲液作用下，结合剂可特异性结合 gDNA，而蛋白和它的成分保留在溶液中。未结合的物质经涮洗后予以去除。纯化的 gDNA 经洗脱液（EB2）或去离子水洗脱。该纯化过程不需要离心柱、滤板、硅膜或磁珠，也不需要真空或过滤步骤，只有离心的步骤，降低了不同孔之间交叉污染的可能性。该试剂盒中使用的深孔板与大多数自动的液体处理器、离心机、机器人及移液设备是兼容的。纯化的 gDNA 可直接用于下游反应，如限制性酶切反应、SNP 分析、PCR、序列分析、全基因组扩增（WGA）和 DNA 甲基化分析等。

亮点

操作简单: 整个提纯过程针对 96 孔板进行优化，方便操作。因为结合过程中不需要硅膜，使用常规的硅膜时结合和清洗时多个过滤的步骤被省去，使得操作整个过程变得简单。

质量可靠: 始终是孔对孔操作，避免交叉污染；采用独特的固体表面可逆结合技术确保分离的 gDNA 不易被污染，质量高，重复性好。

回收率高: 与常规的硅膜或磁珠的纯化方法不同, 这种新型的固体表面结合技术避免了 gDNA 的洗脱死角, 在 96 孔结合板中不存在无效的空间, 最大程度地回收 gDNA。

所需的额外材料

- 无水乙醇
- 异丙醇
- 干净的吸水纸
- Charm Biotech 或 Oragene 唾液保存液
- 单通道和多通道的移液器, 吸头
- 封板膜 (6 张/板)
- 可离深孔板的 Swinging-bucket 离心机, 如 Eppendorf Centrifuge 5810、Beckman GS-6 或 Sorvall 6600
- 涡旋振荡器
- 水浴锅或恒温金属浴

常规防范

1. 该试剂盒仅用于实验。
2. 实验操作时需穿实验服, 戴一次性手套。避免摄食和吸入试剂, 避免与试剂盒中试剂进行直接接触, 一旦接触, 用水彻底冲洗。
3. 提纯核酸时, 采用适当的无菌技术避免核酸酶污染, 使用无菌新吸头避免污染。
4. 当从小孔中洗脱 gDNA 之后, 没有使用的小孔可用封板膜封住, 装在袋中, 室温保存, 用于后续的 gDNA 提纯实验, 六个月之内使用。

实验前准备

1. 从唾液 DNA 裂解液中提纯 gDNA 之前, 需要制备新鲜的 Binding Buffer (KB6) 工作液: 即将 100 μ l Binding Buffer (KB6) 与 400 μ l 异丙醇混合均匀 (1: 4 体积比)。需要制备的 Binding Buffer (KB6) 工作液的体积根据: (1) 待提纯的样品数目; (2) 预期的损失, 在悬浮过程中, 一般会有 10% 的损失。每 100 μ l 细胞裂解液需加 100 μ l 含异丙醇的 Binding Buffer (KB6) 工作液 (1: 1 体积比)。剩余的 Binding Buffer (KB6) 工作液当天予以丢弃。
2. PG-870-1 试剂盒, 加 160 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I (WB1) 中, 充分混匀。在瓶上做好标记表示已加乙醇! 室温保存, 加乙醇的 WB1 在六个月之内使用。
3. PG-870-10 试剂盒, 加 400 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中, 充分混匀。在瓶上做好标记表示已加乙醇! 室温保存, 加乙醇的 WB2 在六个月之内使用。
4. 该试剂盒可从 100 μ l - 1000 μ l 唾液保存液中提纯 gDNA。如果有需要, 4 ml 唾液保存液也可以在一次提纯过程中被提取。在进行 gDNA 提纯实验之前, 为了避免 gDNA 降解, 请遵守标准的 Charm-Protect 唾液 DNA 收集和保存程序。

操作指南

制备唾液裂解液

以下程序适用于从 1 ml 唾液保存液中提纯 gDNA，可根据唾液保存液实际体积作相应调整。

1. 加 20 μ l RNase A (RA2) 到 96 Deep-well Lysis Plate (LP7) 的一个小孔中（如果是一次处理 4 ml 唾液样品，可以直接加 80 μ l RNase A 到收集瓶中。）。
2. 将储存在唾液收集瓶中的唾液样品上下颠倒 7-8 次后静置 3-5 分钟。
3. 从唾液收集瓶中吸取 1 ml 唾液保存液混合物到预先加了 RNase A (RA2) 的小孔中，吸头上下吹打 10 次，混合均匀（当吸取唾液混合液时，注意不要吸到收集瓶底颗粒状沉淀，如食物颗粒。）。
4. 将平板在室温下温育 2-5 分钟。
5. 利用多通道移液器加 20 μ l Proteinase K 到唾液样品中，用一个 1 ml 吸头吹打溶液 15 次，混匀，以获得均一的溶液（这一步非常关键）（如果是一次处理 4 ml 唾液样品，直接加 80 μ l Proteinase K 到收集瓶中。）。
6. 用一个新的封板膜盖住平板，62 °C 温育一小时，期间轻轻地震荡平板（或 50 °C 温育过夜）（如果是处理 4 ml 唾液样品，直接将收集瓶进行温育。）。
7. 将 Lysis Plate (LP7) 以 ≥ 2250 g（最大速度）离心 10 分钟以去除颗粒物质（如食物颗粒，未消化的死细胞和纤维碎片）。
8. 去掉 Lysis Plate (LP7) 上的封板膜。

结合 DNA

1. 利用多通道移液器转移 800 μ l 澄清的唾液裂解液到 Binding Plate (PB5)，注意不要吸到 Lysis Plate (LP7) 管底的碎片沉淀。
2. 利用多通道移液器向每个孔中加 800 μ l 含有异丙醇的 Binding Buffer (KB6) 工作液，充分混匀，用一个新的封板膜盖住平板。
3. 将 Binding Plate (PB5) 以 ≥ 2250 g（最大速度）离心 10 分钟来结合 DNA，去掉 Binding Plate (PB5) 上的封板膜。
4. 去掉 Binding Plate (PB5) 中的液体，可选择下列的两种方法：（1）轻轻倒掉溶液，然后将 96 孔板倒置在一叠干净的吸水纸上，轻敲平板，以完全去除液体；（2）用多通道移液器吸走 96 孔板中的液体，注意在吸的过程中不要接触孔壁，因为 DNA 产物结合在壁上。
5. **选择操作步骤：**如果是提取大于 1 ml 唾液混合液 gDNA，则将大体积（最好不超过 4 ml）的唾液裂解液按照“结合 DNA”部分步骤 1-4 多次离心，使所有的 gDNA 与 Binding Plate (PB5) 结合。注意：再次加入唾液裂解液时，用吸头将唾液裂解液吹打 8-10 次，悬浮管底已结合的 DNA，静置 5 分钟，再加入含有异丙醇的 Binding Buffer (KB6) 工作液。

清洗 DNA

1. 向每个孔中加 1.6 ml 含有乙醇的 Washing Buffer I (WB1)，室温温育平板 60 秒。

2. 用一个新的封板膜盖住平板，将 Binding Plate (PB5) 以 $\geq 2250\text{ g}$ (最大转速) 离心 5 分钟。(如果你处理样品时非常小心，可以省去这一步。)
3. 按照“结合 DNA”部分步骤 6 介绍的方法去除 Binding Plate (PB5) 中的 Washing Buffer I (WB1)。
4. 向每个孔中加 1.6 ml 含有乙醇的 Washing Buffer II (WB2)，室温温育平板 30 秒。
5. 用一个新的封板膜盖住平板，将 Binding Plate (PB5) 以 $\geq 2250\text{ g}$ (最大转速) 离心 5 分钟。(如果你处理样品时非常小心，可以省去这一步。)
6. 按照“结合 DNA”部分步骤 6 介绍的方法去除 Binding Plate (PB5) 中的 Washing Buffer II (WB2)。
7. 重复步骤 4-6，即用 Washing Buffer II (WB2) 共洗两次。
8. 洗完后，为完全去掉 Washing Buffer，在一叠干净的吸水纸上倒置并轻敲平板，在通风厨中静置 10 - 15 分钟以去掉残留的液体 (也可将平板置于 62°C 静置 3-5 分钟)。

gDNA 的洗脱

与 Binding Plate (PB5) 孔壁结合的 gDNA 至少可保存六个月。如果 gDNA 需要洗脱，可进行如下程序

1. 向 Binding Plate (PB5) 的每个孔中加 50 - 150 μl Elution Buffer (EB2)。
2. 上下吸取溶液 10 次，将平板在室温下温育 60 秒。
3. 用一个新的封板膜封住平板。
4. 洗脱的 gDNA 可直接应用于下游。或在密封的平板中 4°C 短期保存或者 -20°C 长期保存。(注意：从 1 ml 唾液保存液混合物种提纯的 gDNA 产量为 2 - 20 μg 。产量取决于不同的个体唾液是如何收集和保存的。)

电泳及下游的应用

取 5-7 μl 提纯的 gDNA 用琼脂糖凝胶电泳进行质检。产量可用分光光度计或其它定量方法。一般 $A_{260}/A_{280} \geq 1.6 - 1.7$ 。平板中纯化的 gDNA 可直接应用于下游反应，如限制性酶切反应、SNP 分析、PCR、STR 分析、DNA 序列分析、全基因组扩增 (WGA) 及其它分子实验操作。

常见问题及解决方案

问题	原因	解决方案
DNA 产量低	起始材料质量差。 裂解不彻底。	确保正确遵守样品收集和保存程序。如果观察到裂解不彻底，增加温育时间。
PCR 没有产物	PCR 反应液中漏加组分。	确保加了所有的组分。核对 PCR 反应的阳性对照和阴性对照。