

Just-a-Tube™ 口腔拭子 gDNA 提纯试剂盒

室温运输和保存，Proteinase K 保存在 4 °C。

试剂盒组成及贮存

Just-a-Tube™ 口腔拭子 gDNA 提纯试剂盒组成如下表所示。所有的组分除了 Proteinase K 需要保存在 4 °C 之外，其余组分室温保存即可。可进行 50 或者 250 次口腔拭子 gDNA 的提纯。

Product Cat. #	TG-591-M	TG-591-L
Purification Scale	50 次	250 次
Binding Tube (BT4)	50 个	250 个
Filter Basket (FB1)	50 个	250 个
Lysis Buffer (PKLB)	3.5 ml	17.5 ml
Binding Buffer (KB6)	6 ml	30 ml
Washing Buffer II (WB2)	18 ml	90 ml
Elution Buffer (EB2)	6 ml	30 ml
Proteinase K (PK2) (20 mg/ml)	1.1 ml	1.1 ml × 5

产品介绍

利用 Just-a-Tube™ 口腔拭子 gDNA 提纯试剂盒可以简单、快速地从口腔拭子 (buccal swabs) 或口腔刷 (buccal brushes) 样本中分离提纯高质量的 gDNA。DNA 样品的纯化仅在一个小管中进行，在这个过程中不需要硅膜和磁珠来结合 DNA。昌美生物将固体表面可逆结合技术 (SSRB) 应用到 Just-a-Tube 系统中，离心管内壁涂有可与 DNA 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 DNA，而蛋白和其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。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：所有的操作步骤都根据 Binding Tube (BT4) 进行优化，操作简单，不需要有机溶剂、磁珠、过滤和抽真空步骤。

质量可靠：始终是管对管操作，有效避免交叉污染，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，产量高：与常规的硅膜或磁珠的纯化方法不同，SSRB 结合技术避免了小柱法或者磁珠法的洗脱死角，可最大程度地回收 gDNA，比小柱法或者磁珠法得到的 DNA 产量更高。

所需的额外材料

- 无水乙醇，异丙醇
- 1.5 ml 或 2.0 ml 离心管，可离 1.5 ml 或 2.0 ml 离心管的离心机
- 口腔拭子，剪刀
- 涡旋振荡器，水浴锅或恒温金属浴

常规防范

- 该试剂盒仅用于实验。
- 实验操作时需穿实验服，戴一次性手套。避免摄取和吸入试剂，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。
- 提纯核酸时，使用无菌新吸头避免污染。

实验前准备

1. 在进行口腔拭子 gDNA 提纯实验之前，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 异丙醇充分混匀（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。悬浮每个拭子样品，需要 520 μ l 含有异丙醇的 Binding Buffer (KB6) 工作液。剩余的 Binding Buffer (KB6) 工作液当天予以丢弃。
2. 制备 Washing Buffer II (WB2) 工作液，对于 TG-591-M 试剂盒，加 72 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中，充分混匀。对于 TG-591-L 试剂盒，加 110 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。

该试剂盒用于从口腔细胞，如人口腔拭子、口腔刷、犬科的脸颊拭子及其它口腔上皮细胞提纯 gDNA。在进行 gDNA 提纯实验之前，为最大程度地减少 gDNA 的降解，请遵守厂商推荐的标准的细胞收集和保存程序。

操作指南

步骤一：制备口腔上皮细胞裂解液

(A) 昌美生物公司 Charm-Protect™ 保存液保存的口腔（鼻腔）拭子操作步骤：

1. 将被 500 μ l 口腔拭子保存液充分浸湿的拭子，连同保存液一起，转移至一个干净 1.5 或 2.0 ml 离心管中（若拭子和保存液本身就保存于小离心管中，则省略此步骤。）。
2. 向管中加入 20 μ l Proteinase K (PK2)，用移液器枪头小心地挤压拭子，使 PK2 与保存液及拭子充分接触。（*注意：此步骤很重要，直接决定 DNA 的产量。）
3. 剪去拭子柄，盖上离心管盖，62 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。若有需要，也可将样品 52 $^{\circ}$ C 温育过夜。
4. 将 Filter Basket (FB1) 放进 Binding Tube (BT4) 中，用干净镊子将温育过的口腔拭子小心地放到 Filter Basket (FB1) 内，盖上 Filter Basket (FB1) 盖子。
5. 将装有拭子和 FB1 的 Binding Tube (BT4) 置于离心机中，以最大转速离心 1 分钟，弃 FB1 和拭子，保留 Binding Tube (BT4) 中的裂解液，同时将温育过的离心管中多余的裂解液加到 Binding Tube (BT4) 中。

(B) 已用其他公司保存液保存的口腔（鼻腔）拭子操作步骤：

1. 将被 500 μ l 口腔拭子保存液充分浸湿的拭子，连同保存液一起，转移至一个干净 1.5 或 2.0 ml 离心管中（若拭子和保存液本身就保存于小离心管中，则省略此步骤。）。
2. 向管中加入 50 μ l Lysis Buffer (PKLB)（若保存液体积不是 500 μ l，则按保存液体积的 1/10 加入 PKLB。）。
3. 向管中加入 20 μ l Proteinase K (PK2)，用移液器枪头小心地挤压拭子，使 PK2 与保存液及拭子充分接触。（*注意：此步骤很重要，直接决定 DNA 的产量。）
4. 剪去拭子柄，盖上离心管盖，62 $^{\circ}$ C 水浴锅或金属浴中温育 30 分钟。若有需要，也可将样品 52 $^{\circ}$ C 温育过夜。
5. 取出 Filter Basket (FB1)，放进 Binding Tube (BT4) 中，用干净镊子将温育过的口腔拭子小心地放到 Filter Basket (FB1) 内，盖上 Filter Basket (FB1) 盖子。
6. 将装有拭子和 Filter Basket (FB1) 的 Binding Tube (BT4) 置于离心机中，以最大转速离心 1 分钟，弃 FB1 和拭子，保留 Binding Tube (BT4) 中的裂解液，同时将温育过的离心管中多余的裂解液加到 Binding Tube (BT4) 中。

(C) 没有用保存液保存的干燥口腔拭子操作步骤：

1. 将 50 μ l Lysis Buffer (PKLB) 和 450 μ l 去离子水混合成 500 μ l 的裂解液，加入干净的 1.5 或 2.0 ml 离心管中。
2. 向管中加入 20 μ l Proteinase K (PK2)，用移液器小心地吹打混匀。（建议：如有多个样本，可以先将 PKLB、去离子水和 PK2 按上述比例混合，然后分装至各小管。）
3. 将刮过口腔的拭子放入离心管中，使拭子充分吸收裂解液，且保证拭子周围有多余裂解液存在（若拭子吸水量过大，可适量增加裂解液体积，至拭子完全浸湿。）（*注意：此步骤很重要，裂解液过少将影响口腔细胞的破碎效果，降低 DNA 产量。）
4. 剪去拭子柄，盖上离心管盖，62 $^{\circ}$ C 水浴锅或金属浴中温育 30 分钟。若有需要，也可将样品 52 $^{\circ}$ C 温育过夜。
5. 取出 Filter Basket (FB1)，放进 Binding Tube (BT4) 中，用干净镊子将温育过的口腔拭子小心地放到 Filter Basket (FB1) 内，盖上 Filter Basket (FB1) 盖子。

6. 将装有拭子和 FB1 的 Binding Tube (BT4) 置于离心机中, 以最大转速离心 1 分钟, 弃 FB1 和拭子, 保留 Binding Tube (BT4) 中的裂解液, 同时将温育过的离心管中多余的裂解液加到 Binding Tube (BT4) 中。

步骤二: 结合 DNA

1. 向 Binding Tube (BT4) 中加入与裂解液等体积的 Binding Buffer (KB6) 工作液 (含有异丙醇), 用吸头吹打或上下颠倒溶液, 将其与口腔细胞裂解液充分混匀。
2. 将 Binding Tube (BT4) 以最大转速 (约 13000 rpm 或 16000 g) 离心 5 分钟来结合 DNA。(注意: 在离心过程中, 离心管盖朝向转子方向放置, 离心后大部分 DNA 聚集在背对管盖的管底侧。)
3. 将 Binding Tube (BT4) 中的液体倾倒入废液收集杯中, 或者用移液器吸走 Binding Tube (BT4) 中央的液体。(注意: 在吸取过程中, 吸头不要碰到管壁)。

步骤三: 清洗 DNA

1. 向 Binding Tube (BT4) 中加 0.8 ml Washing Buffer II (WB2) 工作液 (含有乙醇), 上下颠倒 3-4 次, 室温温育 30 秒。
2. 室温下以最大转速将 Binding Tube (BT4) 离心 1 分钟 (注意: 在离心过程中, 离心管盖朝向转子中心方向放置。)
3. 按照“结合 DNA”部分操作 3 的方法去掉 Binding Tube (BT4) 中的 Washing Buffer II (WB2)。
4. 重复上述步骤 1、2 和 3, 即用 Washing Buffer II (WB2) 洗两次。
5. Washing Buffer II (WB2) 洗完后, 将 Binding Tube 短暂离心, 用 200 μ l 吸头吸走管底残留液体, 置于通风橱中干燥。

步骤四: 洗脱 DNA

与 Binding Tubes (BT4) 管壁结合的 gDNA 至少可以保存 6 个月。如果 gDNA 需要洗脱, 可进行如下操作:

1. 向 Binding Tube 中加 100 μ l Elution Buffer (EB2) (如果需要高浓度的 DNA, 可加 50 μ l Elution Buffer。)
2. 方法 1 (涡旋洗脱): 盖上 Binding Tube 的盖子, 涡旋 30 秒后以最大转速短暂离心, 使所有的液体集中到管底; 方法 2 (震荡洗脱): 盖上 Binding Tube 的盖子, 以低速震荡管子 4-5 分钟; 方法 3 (移液枪洗脱): 用移液枪吸头上下吹打溶液 8-10 次, 盖上 Binding Tube 的盖子, 在室温放置 1 分钟。
3. 洗脱的 gDNA 可直接应用于下游反应, 或置于 4 $^{\circ}$ C 短期储存或者 -20 $^{\circ}$ C 长期储存。

电泳及下游的应用

提纯的 gDNA 可用琼脂糖凝胶电泳进行质检, 也可用分光光度计或荧光标记法测定产量。每个口腔拭子预期的 gDNA 产量为 0.5-8 μ g, 产量取决于采样个体差异以及拭子的收集和保存方式。 $A_{260/280}$ 一般大于 1.7。Binding Tube (BT4) 中纯化的 gDNA 可直接用于下游反应, 如限制性酶切反应、SNP 分析、PCR、STR 分析、DNA 序列分析、全基因组扩增 (WGA) 及其它分子实验操作。

注意: 如果需要高通量提纯口腔拭子 gDNA, 欢迎使用我们的 Just-a-PlateTM 96 孔板口腔拭子 gDNA 提纯试剂盒。

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	确保正确遵守手册推荐的样品收集和保存程序。
	裂解不彻底	将 Proteinase K 消化的时间延长 15 分钟。
PCR 没有产物	PCR 反应混合物中漏加组分	确保加了所有的组分。核对 PCR 反应的阳性对照和阴性对照。