

GTpure™ 口腔细胞DNA提取试剂盒

一、试剂盒组成

Cat.NO.	566-050
离心柱 C294	50
收集管 C947	50
DR Buffer	20ml
PE Solution	30ml
WA Buffer	10ml
DE Buffer	15ml
Proteinase K 干粉	11mg
RNase A solution	30 μ l \times 2
说明书	1份

二、产品说明

规格	离心柱型
口腔细胞收集方法	漱口水或拭子
产量	1-6 μ g/单次漱口水, 0.5-3 μ g/单个拭子
离心柱最大载量	800 μ l
操作时间	单次制备 30 分钟
下游应用	限制性酶切、PCR 和基因型分析等

三、注意事项

1. Proteinase K 干粉需 4 度保存, 溶解后于-20 度保存。
2. RNase A 溶液于 4 度或-20 度保存。
3. 口腔细胞样品要在进食或饮水后至少 30 分钟取样。早餐前取样可获得最高的产量。

四、实验准备

1. 向Proteinase K干粉中加入 0.275ml灭菌ddH₂O和 0.275ml甘油, 温和颠倒直至完全溶解, 请勿漩涡振荡, 置于-20 度保存。也可选择, 向每管Proteinase K干粉中加入 0.55ml灭菌ddH₂O, 分装成小等份于-20 度或-80 度保存, 避免反复冻融。要保证蛋白酶K完全溶解, 一般在室温下需要 15 至 30 分钟。
2. 在温度较低时注意观察 DR 和 PE 中是否有沉淀, 如有请将缓冲液在 37 度温育溶解。
3. 请准备 60 $^{\circ}$ C 水浴或其它加热设备
4. 在实验开始前取适当体积的 DE Buffer 在 70 度预热。
5. 向 WA Buffer 中加入 40ml 无水乙醇 (96-100%)。

五、操作步骤

【从漱口水中提取口腔细胞 DNA】:

1. 采用 10ml 水或生理盐水漱口 1 分钟收集口腔细胞, 将漱口水吐进 50ml 离心管中。
***要求样品提供者在样品收集前至少 30 分钟内不能进食及饮水。早餐前取样可获得最高产量。**
***如果使用超过 10ml 的漱口水, 应按比例增加 DR Buffer、Proteinase K, PE Buffer 和乙醇的使用体积。**
2. 将 50ml 离心管置于 4 度 4000 \times g 离心 5 分钟, 用移液器吸除尽可能多的上清而不破坏细胞沉淀。



3. 用 300µl DR Buffer 重悬细胞沉淀，反复抽吸 10-20 次至完全混匀，转移细胞悬液至 2ml 离心管中。
*** 确保在细胞悬液中无可见小块可使 DNA 产量最大化。**
4. 加入 10µl Proteinase K，旋涡 10-15 秒混匀，并在 60 度孵育混合物 15 分钟，孵育后简短离心混合物。
5. 加入 1µl RNase A，室温下放置 3 分钟去除 RNA。
6. 加入 300µl PE Solution，颠倒 5-10 次混匀，16000×g 离心 3 分钟。
*** 如果离心机转速达不到 16000×g，可延长离心时间。**
7. 小心转移上清至一个新的 1.5ml 离心管中，加 300µl 无水乙醇，颠倒 10-15 次，彻底混匀。
8. 将离心柱 C294 放入一个收集管中。
9. 向离心柱内加入以上混合物，6000×g 离心 30 秒，弃废液，将离心柱放回收集管中。
*** 如果样品体积大于 800µl，先加入 800µl 至离心柱，离心弃废液，再重复此操作转移剩余样品。**
10. 加入 500µl WA Buffer，6000×g 离心 30 秒。弃废液，将离心柱放回收集管中。
*** 确保 WA Buffer 中加有乙醇。**
11. 16000×g 再次离心 1 分钟。
*** 再次离心是为了充分去除残留在吸附膜上的乙醇，乙醇残留可能抑制下游实验。**
12. 将离心柱放入一个洁净的 1.5ml 离心管中。
13. 向离心柱的膜中央加入 200µl 70 度预热的 DE Buffer，放置 1 分钟。
14. 6000×g 离心 30 秒收集基因组 DNA。
*** 洗脱 DNA 可于 4 度保存 1 或 1 天，长期保存应放在 -20 度。**

【从拭子中提取口腔细胞 DNA】:

1. 将一个洁净的拭子伸入口腔，在面颊内侧一处不断擦拭，擦 20 次收集口腔细胞。
*** 使用专门的口腔拭子或棉签收集口腔细胞。**
*** 用滚动摩擦的方式擦拭可收集大量的细胞。**
2. 将擦拭过的拭子置于 2ml 离心管内，用干净的剪刀将拭子头从杆上剪下。
3. 加入 300µl DR Buffer，接着加入 10µl Proteinase K，旋涡 10-15 秒混和，1000×g 简短离心几秒后，将混合物于 60 度孵育 15 分钟。
4. 1000×g 简短离心几秒。
5. 从混合物中去除拭子头。将拭子头向离心管内壁挤压，获得尽可能多的液体。
6. 去除拭子头后，加入 1µl RNase A solution，室温放置 3 分钟去除 RNA。
7. 加入 300µl PE Solution，颠倒 5-10 次混匀，16000×g 离心 3 分钟。
*** 如果离心机转速小于 16000×g，可延长离心时间。**
8. 小心转移上清至 1 个新的 1.5ml 离心管内，加入 300µl 无水乙醇，颠倒 10-15 次彻底混匀，
9. 将离心柱放入收集管内，将样品加入离心柱内，6000×g 离心 30 秒。弃废液，将离心柱放回收集管中。
*** 如果样品体积大于 800µl，先加入 800µl 至离心柱，离心弃废液，再重复此操作转移剩余样品。**
10. 加入 500µl WA Buffer，6000×g 离心 30 秒。弃废液，将离心柱放回收集管中。
*** 确保 WA Buffer 中加有无水乙醇。**
11. 16000×g 再次离心 1 分钟。
*** 再次离心是为了充分去除残留在吸附膜上的乙醇，乙醇残留可能抑制下游实验。**
12. 将离心柱放入一个洁净的 1.5ml 离心管中。
13. 向离心柱的膜中央加入 200µl 70 度预热的 DE Buffer，放置 1 分钟。
14. 6000×g 离心 30 秒收集基因组 DNA。
*** 洗脱 DNA 可于 4 度保存 1 或 1 天，长期保存应放在 -20 度。**