

## 拭子洗液细菌 DNA 试剂盒说明书

### 产品组成

拭子洗液细菌 DNA 试剂盒 Cat. No.	5 次制备 4310005	50 次制备 4310050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液	120 $\mu$ l	1.2 ml
Buffer A10	150 $\mu$ l	1.2 ml
Carrier RNA	40 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Buffer AC (浓缩液)	3 ml	18 ml
Buffer WB (浓缩液)	1.5 ml	12 ml
Buffer TE	1.5 ml	5 ml
说明书	1 份	1 份

### 产品储存

1. 蛋白酶 K 贮存液和 Carrier RNA 可常温运输，收到后请置于 -20°C 储存。
2. 其他试剂和物品如果储存于室温 (0~30°C)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8°C，可延长产品的有效期至两年以上。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本产品适合从 180  $\mu$ l 拭子洗液中分离纯化细菌总 DNA。拭子洗液中的细菌经 Buffer A10 和蛋白酶 K 溶解后释放 DNA，再经 Buffer AC 调整缓冲体系，使 DNA 结合在核酸纯化柱上，残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 异丙醇、无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头（推荐使用滤芯吸头，可防止样本间气溶胶的交叉污染）
3. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
4. 台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器
6. 水浴锅或干浴锅

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 56°C，并将 Buffer A10（当室温低于 15°C 时极易产生沉淀，56°C 温育后沉淀消失）和 Buffer TE 温育至 56°C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer AC 中加入异丙醇，在 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“异丙醇已加”、“乙醇已加”的标记。

## 操作步骤：

**1. 吸取 1 ml 含有沉淀物的拭子洗液（或分泌物洗液）到 1.5 ml 离心管中，盖上管盖，12000 rpm 离心 1 分钟，吸弃 800  $\mu$ l 上清液，保留约 200  $\mu$ l 的沉淀物及上清。**

\* 拭子洗液中如有沉淀物，请务必吸取并转移到1.5 ml离心管中，否则会影响后续检测的敏感性。

\* 拭子洗涤液或分泌物洗液可以用生理盐水或PBS溶液替代。

**2. 加入 20  $\mu$ l Buffer A10 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀，56°C水浴 10 分钟。**

\* 当样本数量较多时，可预先将Buffer A10和蛋白酶K贮存液按1:1的体积预先混合成裂解液，每个样本中直接加入40  $\mu$ l预混的裂解液。预混的裂解液应立即使用，预混超过30分钟后的裂解液可能会降低裂解效果。

\* Buffer A10使用前应确保无沉淀析出；或析出的沉淀经过温育已经完全溶解。

\* 水浴后溶液应澄清透亮，如果仍有不可溶解物存在，请于12000 rpm离心1分钟，弃管底沉淀，吸取上清液转移到另一个洁净的1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

**3. 加入 5  $\mu$ l Carrier RNA 和 500  $\mu$ l Buffer AC，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀。**

\* 当样本数量较大时，可预先将Carrier RNA和Buffer AC按1:100的体积预先混合成结合液，每个样本中直接加入505  $\mu$ l预混的结合液。

\* 当样本中的总DNA含量超过1  $\mu$ g时，可省略Carrier RNA的加入；如果不能确定样本中DNA的含量，请勿省略Carrier RNA的加入，否则会严重影响检测的灵敏度。

\* 确认在Buffer AC中已经加入异丙醇。

**4. 将步骤 3 中的混合液加入到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

**5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

\* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

\* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

**6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心 1 分钟。**

\* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

**7. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50  $\mu$ l 56°C预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。**

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

**8. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 - 20°C备用。**