

HiPure Sputum DNA Kit

痰液 DNA 试剂盒

本产品适合于从痰液样品中抽提 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR，定量 PCR，Southern Blot，病毒 DNA 检测等实验。

产品组份

产品编号	D3133-01	D3133-02	D3133-03
纯化次数	20 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	20	50	250
2ml Collection Tubes	20	50	250
DTT Powder	200 mg	500 mg	2.5 g
Buffer ATL	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer AL	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml

保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。DTT 和 Proteinase K 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月)建议保存于-20~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 振荡金属浴
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。
- 溶解 DTT (1M) : 加入 1.2ml (20Preps), 3ml(50Preps)或 7.5ml(250Preps)的灭菌水至 DTT 干粉, 颠倒混匀使之充分溶解, 分装保存于-20 度。
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

A: 直接提取:

1. 称取约 0.1~0.2g 痰样品至 2ml 离心管中。
2. 加入 0.5ml Buffer ATL 、5ul 1M DTT 和 20ul Proteinase K 至样品中, 涡旋混匀, 55 度振荡温育 30~60 分钟直至痰液完全液化。
3. (可选)若需要提取微生物 DNA, 95 度温育 15 分钟进一步裂解微生物。
4. 13,000 x g 离心 3 分钟, 转移 500ul 上清液至新的离心管中。
5. 加入 500ul Buffer AL 至样品中, 涡旋 10 秒, 70℃温浴 10 分钟。
6. 加入 500ul 无水乙醇, 涡旋 10 秒, 按第 7 步过柱流程进行操作。

B: 痰的液化处理(DTT)

1. 取约~1g 痰样品至 15ml 离心管中, 加入 4ml Buffer PBS 和 40ul 1M DTT 至样品, 涡旋混匀 15 秒。室温放置 15-30 分钟, 其间反复涡旋数次让痰液充分液化。
2. 若只需提取人源 DNA, 于 500 x g 离心 15 分钟收集细胞; 若需要提取含微生物 DNA

时，于 10,000 × g 离心 5 分钟收集微生物和细胞，小心倒弃上清液。

3. 加入 500µl Buffer ATL、5µl 1M DTT 和 20µl Proteinase K，55℃振荡温浴 30 分钟直至样品完全消化。
4. (可选) 若需要提取微生物 DNA，把样品于 95 度再温育 15 分钟裂解微生物。
5. 加入 500µl Buffer AL 至样品中，涡旋 10 秒，70℃温浴 10 分钟。
6. 加入 500µl 无水乙醇至样品中，涡旋 10 秒，按第 7 步过柱进行操作。

C: 痰的液化处理(NaOH, 结核 DNA)

1. 取约~1g 痰样品至 15ml 离心管中，加入 4ml 4% NaOH 至样品，涡旋混匀 15 秒。室温放置 15-30 分钟，其间反复涡旋数次让痰液充分液化。
2. 13,000 × g 离心 10 分钟收集微生物，小心倒弃上清液。
3. 加入 250µl Buffer ATL 至样品中，涡旋重悬样品，95 度温育 15 分钟。
4. 加入 250µl Buffer AL 和 20µl Proteinase K 至样品中，涡旋 10 秒，70℃温浴 10 分钟。
5. 加入 250µl 无水乙醇至样品中，涡旋 10 秒。
6. 按第 7 步过柱进行操作。

过柱纯化

7. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移<750µl 混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
8. (可选:混合液超过 750µl) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。弃去滤液和收集管。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 1 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 3 分钟。
12. **将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 20~50µl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。**
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8°C，长期保存需保存于-20°C。