

操作手册

尿液 DNA 提取试剂盒

Catalog No. TD361-50 (50 次反应)

Highlights

- 每次可从 40ml 以内的尿液提取到游离或总 DNA。
- 获得的 DNA 纯度好，可以直接用于 qPCR、高通量测序等分子生物学实验。

Ver.1.0.1

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
蛋白酶 K 套装	-20°C (混匀之后)	2x20 mg
尿液稳定剂	室温	140 ml
纯化珠	室温	1ml
尿液细胞消化液	室温	20ml
基因组 DNA 裂解液	室温	50 ml
尿液 DNA 洗涤液 1	室温	10 ml
尿液 DNA 洗涤液 2	室温	12 ml
DNA 洗脱液	室温	4 ml
1 号柱 S	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	100 个

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

注意事项:

1. 环境温度低时消化液或者裂解液可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 蛋白酶 K 及其保存液可常温运输。使用前需要添加 1040 μ l 蛋白酶 K 保存液到蛋白酶 K 里，蛋白酶 K 浓度为 20mg/ml。

特性:

- 样品种类: 尿液
- 处理的体积量: 40ml
- DNA 纯度: 获得的 DNA 纯度好，可以直接用于 qPCR 高通量测序等各种分子生物学实验。
- DNA 回收情况: 1 个柱子最大的结合量是 5 μ g.回收的 DNA 根据不同的尿液情况，得率也不同，一般女性尿液

得率要高于男性，健康女性尿液的得率范围一般是在 6-1000 ng/ml。健康男性尿液的得率范围一般是在 2-20 ng/ml。

- **DNA 大小:** 回收的 DNA 片段范围在 100bp 到 23kb 之间。
- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴（55℃）。微型离心机，负压多联器或立式离心机。

试剂制备:

1. 使用前需要添加1040 μ l蛋白酶K保存液到蛋白酶K 20mg 里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。混匀之后放在-20℃保存
2. 使用前需要添加48 ml 100%的无水乙醇到12ml的**尿液DNA洗涤液2**中。

操作步骤:

从 ≤ 40 ml 的样品中提取 DNA

除非特殊说明，一般常温（15-30℃）进行以下操作步骤。

以下操作步骤分 3 个部分

A) 总 DNA(细胞内和游离)沉淀。 B) 蛋白消化。 C) DNA 纯化。

A) 总 DNA(细胞内和游离)沉淀。（如果只需要细胞内或者游离的 DNA,操作步骤见附录）

- 1.将 40ml 的尿液转移到合适的离心管内。
2. 添加 70 μ l 的尿液稳定剂到每 1ml 的样品中，涡旋混匀。（例如 350 μ l 的尿液稳定剂到 5ml 的尿液样品中）。添加了稳定剂的尿液可以在室温下最长保存 1 个月，需要提取核酸时，将添加了稳定剂的尿液涡旋振荡，混匀。
3. 如果处理 ≤ 14 ml 的尿液添加 10 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），如果处理 14-40ml 的尿液，需要添加 10 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）。
- 4.在 3, 000xg 下离心 15 分钟。收集细胞沉淀。

B) 蛋白消化.

5. 去除上清，不要搅动细胞沉淀，大约保留 100-400 μ l 的细胞沉淀。

推荐：如果尿液处理量在 15-40ml 之间，大约应保留 200 μ l 细胞沉淀.

6. 添加等体积的尿液细胞消化液到上述细胞沉淀中。（例如 200 μ l 尿液细胞消化液到 200 μ l 细胞沉淀中）

7. 添加 5% 的蛋白酶 K 到重悬的细胞沉淀中。（例如 20 μ l 蛋白酶 K 到 400 μ l 混合物中），涡旋混匀，在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。

C) DNA 纯化（所有离心步骤均在 $\geq 16,000$ xg 下进行，除非特殊说明）

8. 添加 1 倍体积的基因组 DNA 裂解液到消化完后的混合液中。（例如，添加 420 μ l 的基因组 DNA 裂解液到 420 μ l 消化后的混合液中。）

9. 将全部样品转移到 1 号柱 S 中，1 号柱 S 套在一个收集管里。离心。

（如果样品体积超过 800 μ l 需要反复填充，因为柱子最大容积为 800 μ l）

10. 将 1 号柱 S 套在 1 个新的收集管里。

11. 添加 200 μ l 的尿液洗涤液 1 到 1 号柱 S 中，离心 1 分钟，去除滤出液。

12. 添加 700 μ l 的尿液洗涤液 2 到 1 号柱 S 中，离心 1 分钟。去除滤出液。

13. 添加 200 μ l 的尿液洗涤液 2 到 1 号柱 S 中，离心 1 分钟。去除滤出液。

14. 将 1 号柱 S 移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 $\geq 10\mu$ l 的 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好）。室温下放置 3-5 分钟，全速离心 1 分钟来洗脱 DNA。

简易流程图

总 DNA 沉淀

尿液体积	≤ 1 ml	1-14ml	14-40ml
配套的离心管	1.5ml 离心管	15ml 离心管	50ml 离心管
尿液稳定剂	70 μ l/ml 尿液		
纯化珠	10 μ l	10 μ l	20 μ l

3000 x g 下离心 15 分钟

蛋白消化

尿液细胞沉淀体积	100 μ l	100 μ l	200 μ l
尿液细胞消化液	100 μ l	100 μ l	200 μ l
蛋白酶 K 溶液	10 μ l	10 μ l	20 μ l

55 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟

DNA 纯化

基因组 DNA 裂解液	210 μ l	210 μ l	420 μ l
尿液洗涤液 1	200 μ l		

尿液洗涤液 2	700 μ l, 200 μ l
DNA 洗脱液	$\geq 10\mu$ l

附录 A

分别提取细胞和游离 DNA 的步骤

1. 提取细胞内 DNA

- a. 在 3, 000 x g 离心力下离心 40ml 尿液。
- b. 接下来按照主操作步骤的 B) 蛋白消化步骤进行下面的处理。

2. 提取游离 DNA

- a. 在 3, 000 x g 离心力下离心 40ml 尿液 15 分钟。
- b. 不要搅动细胞沉淀，将上清转移到一个合适的离心管内。
- c. 添加 70 μ l 的尿液稳定剂到每 1ml 的样品中，涡旋混匀。（例如 350 μ l 的尿液稳定剂到 5ml 的尿液样品）。
添加了稳定剂的尿液可以在室温下最长保存 1 个月，需要提取核酸时，将添加了稳定剂的尿液涡旋振荡，混匀。
- d. 如果处理 ≤ 14 ml 的尿液添加 10 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀），如果处理 14-40ml 的尿液，需要添加 10 μ l 纯化珠（使用之前需要涡旋混匀）。
- e. 在 3, 000xg 下离心 15 分钟。
- f. 接下来按照主操作步骤的 B) 蛋白消化步骤进行下面的处理。