

## GF-1 法医样品 DNA 提取试剂盒说明书

版本 2.1

### 产品简介:

GF-1 法医样品 DNA 提取试剂盒能快速、有效纯化微量生物原料中的 DNA，如血迹，生物体液，口腔拭子，唾液，精液，毛发，羽毛和指甲。本试剂盒采用一个经特殊处理的硅基材料固定到柱子中，在高盐下有效地结合 DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，使用最佳缓冲液，以确保只有 DNA 被分离，在随后的洗涤步骤中除去细胞蛋白质、代谢物、盐和其他低分子量杂质。高纯度的基因组 DNA 在水或低盐缓冲液中被洗脱，应用于许多常规分子生物学实验，如 PCR、酶切、Southern 印迹杂交和其他操作。

### 试剂盒组成成份

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-FD-025	CN/GF-FD-100	CN/GF-FD-200
<b>组份</b>				
GF-1 DNA 吸附柱 (GF-1DNA Binding columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
缓冲液 STL (Buffer STL)	2ml	10ml	25ml	50ml
缓冲液 BL (Buffer BL)	2ml	10ml	30ml	60ml
平衡缓冲液 (Equilibration Buffer)	0.7ml	3.5ml	12.5ml	25ml
HB 缓冲液 (HB Buffer)	3ml	15ml	55ml	110ml
DNA 洗涤液 (浓缩液) *	1.5ml	7.5ml	2 x 18ml	3 x 25ml
Wash Buffer(concentrate)*				
洗脱液 (Elution Buffer)	2ml	15ml	50ml	2x 50ml
OB 蛋白酶*(OB Protease*)	0.15ml	0.75ml	2x 30ml	4 x 30ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标\*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 法医样品 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。

本试剂盒仅供研究使用。

### 自备材料

无水乙醇 (>95%)

异丙醇

PBS

DTT

RNase A (无 DNA 酶) (20mg/ml)

缓冲液A (150mM NaCl, 10mM EDTA, pH8.0)

缓冲液B (100mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 500mM NaCl, 1% SDS, 2% β-巯基乙醇)

### 配制方案

贴有洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

### 样品 (5 次):

在DNA洗涤液中加入 6ml无水乙醇。

### CN/GF-FD-025 (25 次)

在DNA洗涤液中加入 30ml无水乙醇。

### CN/GF-FD-100(100 次)

在DNA洗涤液中加入 72ml无水乙醇。使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

### CN/GF-FD-200 (200 次)

在DNA洗涤液中加入 100ml无水乙醇。使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

### 储存及稳定性

- 所有溶液 (除 OB 蛋白酶) 20°C-25°C 保存。
- OB 蛋白酶-20°C 保存。建议将 OB 蛋白酶分装成小包装保存，避免反复冻融。
- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存12个月。缓冲液 BL 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

### 化学危害

缓冲液 BL 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中来即可除去胍盐。

### 操作步骤

#### 提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- DNA 洗涤液 (浓缩液) 在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照配制方案。
- 如果缓冲液 BL 出现沉淀或结晶，请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。
- 预先设定 60 °C 和 55 °C 水浴锅。
- 70 °C 预热洗脱液。

### I 样品制备

#### A、干血液、体液和精液斑

- 1、从滤纸上剪切或切出试样斑 (不要超过 1cm<sup>2</sup>)，将滤纸切成小块放入 1.5ml 微量离心管。
- 2、加入 200μl 缓冲液 STL，漩涡振荡充分混匀。55°C 温育 15 分钟，温育期间每 2 分钟混匀一次。
- 3、加入 25μl OB 蛋白酶，漩涡振荡充分混匀。60°C 温育 45 分钟，温育期间每 15 分钟混匀一次。
- 4、加入 225μl 缓冲液 BL，漩涡振荡。60°C 温育 10 分钟。
- 5、加入 300μl 异丙醇，漩涡振荡充分混匀。
- 6、进行第二步 DNA 分离。

#### B、精液

参照用户自备材料准备缓冲液A和缓冲液B。

- 1、在含有 10ml 缓冲液A的玻璃(Corex)离心管中，加入 50-250μl 精液样本，以最大速度漩涡振荡 10 秒，充分混匀，2,500 x g (5500rpm) 离心 10 分钟。

注：冷冻样品必须彻底解冻后方可使用。Corex管可以防止精子细胞附着在管壁上。

- 2、小心去掉上清，留下 1ml 缓冲液A和沉淀。

3、漩涡振荡 10 秒，最大速度瞬时离心，收集任何附着在管壁上的样品。转移全部样品到 1.5ml 离心管。

4、加入 0.5ml 缓冲液 A 到 Corex 管，漩涡振荡 10 秒，最大速度瞬时离心，收集任何附着在管壁上的样品。转移全部样品到上述同一个 1.5ml 微量离心管中。

5、14,000 x g (15,000rpm) 离心 2 分钟，去除上清，不要碰到精液沉淀。

6、在沉淀中加入 200μl 缓冲液 B 重新悬浮沉淀。加入 50μl OB 蛋白酶，漩涡振荡充分混匀，60°C 温育 2 小时，温育期间每 30 分钟混匀一次。

**注：裂解时间取决于源材料的大小和密度。**

7、加入 250μl 缓冲液 BL，漩涡振荡充分混匀。

8、加入 250μl 无水乙醇，漩涡振荡充分混匀。

9、进行第二步 DNA 分离。

### C、口腔拭子

1、用棉拭子紧紧的贴着脸颊内表面刮擦 6-7 次。

2、切断含有样本的拭子条末端，放入 2ml 微量离心管。

3、加入 550μl PBS、25μl OB 蛋白酶和 550μl 缓冲液 BL，漩涡振荡充分混匀。60°C 温育 30 分钟，温育期间偶尔混匀。

4、加入 550μl 无水乙醇，漩涡振荡充分混匀。

5、进行第二步 DNA 分离。

### D、来自于生物体液中的细菌

1、将样品置于一干净的微量离心管，5,000 x g (8,000rpm) 离心 10 分钟沉淀细菌细胞，去除上清。

2、加入 200μl 缓冲液 STL 重新悬浮细菌沉淀。

3、加入 25μl OB 蛋白酶，漩涡振荡充分混匀。60°C 温育 45 分钟，温育期间每 15 分钟混匀一次。

4、加入 225μl 缓冲液 BL，漩涡振荡混匀。60°C 温育 10 分钟。

5、加入 300μl 异丙醇，漩涡振荡充分混匀。

6、进行第二步 DNA 分离。

### E、眼、鼻和其他拭子

1、将样品置于一干净的 2ml 微量离心管加入 1.5ml PBS，漩涡振荡充分混匀。30°C 温育 2-3 小时。

2、5,000 x g (8,000rpm) 离心 10 分钟沉淀细菌细胞，去除上清。

3、加入 200μl 缓冲液 STL 重新悬浮细菌沉淀。

4、加入 25μl OB 蛋白酶，漩涡振荡充分混匀。60°C 温育 45 分钟，温育期间每 15 分钟混匀一次。

5、加入 225μl 缓冲液 BL，漩涡振荡混匀。60°C 温育 10 分钟。

6、加入 300μl 异丙醇，漩涡振荡充分混匀。

7、进行第二步 DNA 分离。

### F、唾液

1、收集 1.5ml 唾液到一干净的含有 6ml PBS 的 15ml 离心管中。

2、2,000 x g (5,000rpm) 离心 5 分钟，丢弃上清，加入 180μl PBS 重新悬浮沉淀。

3、转移样品到一干净的 1.5ml 微量离心管。

### RNA 的去除 (可选)

如果要求 DNA 中无 RNA 污染，则加入 20μl RNA 酶 A (无 DNA 酶，20mg/ml)。

4、加入 25μl OB 蛋白酶和 200μl 缓冲液 BL，漩涡振荡 30 秒，充分

混匀。60°C 温育 15 分钟，温育期间每 5 分钟混匀一次。

5、加入 200μl 无水乙醇，漩涡振荡充分混匀。

6、进行第二步 DNA 分离

### G、毛发、指甲和羽毛

1a、将头发剪成小段 (0.5-1cm)，包含根部 (最大 20mg)。

1b、将指甲切成小块，大小小于 2mm<sup>2</sup> (最大 20mg)。

1c、将初级飞羽切成小块 (0.5-1cm)。若是大鸟、中级尾巴或胸部羽毛都可以用。

2、将样品放入 1.5ml 微量离心管，加入 250μl 缓冲液 STL、25μl OB 蛋白酶和 20μl 1M DTT，漩涡振荡充分混匀。60°C 温育 30 分钟，温育期间偶尔混匀。

3、加入 250μl 缓冲液 BL，漩涡振荡充分混匀。

4、加入 250μl 无水乙醇，漩涡振荡充分混匀。

5、进行第二步 DNA 分离。

### II、DNA 分离

1、加入 100μl 平衡缓冲液至含有干净收集管的柱子中，室温静置 4 分钟，最大转速离心 20 秒。

2、转移 600μl 样本到柱子中，8,000 x g (10,500rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

重复操作剩余样本，丢弃废液和收集管，将柱子放入一新的收集管。

**对于 A、D、E、F、G 样本，进行步骤 3。**

**对于 B、C 样本，进行步骤 4。**

3、加入 500μl HB 缓冲液，8,000 x g (10,500rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

4、加入 750μl 洗涤液，8,000 x g (10,500rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液和收集管。

**注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释 (参照配制方案)。**

5、将柱子放入一新的收集管，加入 750μl 洗涤液重复洗涤一次，8,000 x g (10,500rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。最大转速 (>13,000 xg) 离心 2 分钟，去除残留乙醇。

6、将柱子放入一新的微量离心管，取 50-100μl 洗脱液 (70°C 预热) 直接加入到柱子的膜中央，室温静置 3 分钟。8,000 x g (10,500rpm) 离心 1 分钟。DNA 4°C 或 -20°C 保存。

**注：确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续的酶反应，但仍可洗脱 DNA。如果用水洗脱 DNA，PH7.0-8.5 时洗脱效果最好。当没有缓冲剂存在的情况下，DNA 可能降解，此时 DNA -20°C 保存。**

### 故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	样品裂解不完全	使用缓冲液 STL 和 OB 蛋白酶中裂解时，延长温育时间 10 分钟。
		确保样本切成小片。
		确保加入的缓冲液 BL 量正确。缓冲液 BL 和样本已漩涡振荡充分混匀。

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	未加入乙醇	确保在样本装载到柱子之前，已加入乙醇。使用新样本重新提取。
	柱子堵塞	请参照“样品裂解不完全”的建议处理。
	OB蛋白酶活性降低	OB蛋白酶小包装保存，避免反复冻融。确保OB蛋白酶-20°C保存。
	DNA洗涤液配制错误	请参照“配制方案”。使用新样本重新提取。
	洗脱效果差	洗脱液 70°C 预热 加入洗脱液后室温温育柱子 3 分钟。
纯度低 (A260/280)	OB蛋白酶活性降低	请参照“DNA得率低”
	样品裂解不完全	请参照“DNA得率低”
洗脱的DNA在下游应用中性能差	洗脱下来的DNA含有残留乙醇	最大转速 (>13,000 x g) 离心柱子 2 分钟以去除残留乙醇。
	用TE缓冲液来洗脱DNA。TE缓冲液中的EDTA可能抑制后续的酶反应。	用洗脱液或PH为 7.0-8.5 的水洗脱DNA。

#### 上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

#### Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivantechnologies.com

international@vivantechnologies.com

Web: www.vivantechnologies.com