

提纯步骤	说明
7. 用移液管吸头小心地将干净的上清液转移到新的微量离心管中。丢弃含有杂质的团粒。	<ul style="list-style-type: none"> 团粒含有浑浊的杂质。如果不小心碰到团粒，就必须将微量离心管重新离心。
8. 在500 μ L的上清液中加入室温下浓度为95%至100%的乙醇600 μ L。轻轻倒转10次，使其混合。	<ul style="list-style-type: none"> 根据样本中的DNA含量，在与乙醇混合的过程中，DNA会沉淀，可能会以DNA纤维凝块或细小沉淀物的形式出现。 即使看不到凝块，只要认真按照下面的步骤执行，就可以重新获得DNA。
9. 将样本在室温下放置10分钟，使DNA充分沉淀。	<ul style="list-style-type: none"> 不建议在-20$^{\circ}$C的温度下进行培养，因为杂质可能会与DNA一起沉淀。
10. 将微量离心管按一定的方向放入微离心机中。在室温下离心2分钟，转速为15,000 $\times g$ 。	<ul style="list-style-type: none"> 例如，将每个微量离心管放在微离心机中，盖子的张合部分远离转子中心。离心后，就可以找到团粒的位置（即使是太小而不容易看到的团粒也可找到），团粒将出现在微量离心管顶端张合部分下面。
11. 用移液管吸头小心地去除上清液并将其丢弃。注意不要碰到DNA团粒。	<ul style="list-style-type: none"> 这种团粒就含有DNA。团粒的丢失就意味着丢失DNA。 旋转微量离心管，使团粒附着在上管壁，这样您就可以安全地沿着下管壁移动移液管吸头，然后去除所有的上清液。 上清液可能含有杂质，因此应当尽可能彻底去除。 团粒若过度干燥，可能会使DNA更加难以溶解。
12. 乙醇清洗： 小心地加入250 μ L浓度为70%的乙醇。 在室温下放置1分钟。 在不碰到团粒的情况下彻底去除乙醇。	<ul style="list-style-type: none"> 一定要去除样本中的全部乙醇。残留乙醇可能影响分析结果。 注意不要碰到DNA团粒。 DNA团粒可能很小。 如果团粒分离，让样本在离心机中离心5分钟，转速为15,000 $\times g$。 去除浓度为70%的乙醇后，可对微量离心管进行脉冲旋转，以清除残留的乙醇。
13. 加入100 μ L的TE溶液（见第1页）以溶解DNA团粒。旋转至少5秒钟。	<ul style="list-style-type: none"> 如想获得较高浓度的DNA，就应当使用50μL的TE。 注意：大量高分子量的DNA的完全水化（溶解）比较慢。 DNA的不完全水化可导致DNA浓度估计不准确并使下游应用（如PCR）失败。
14. 请通过在室温下培养一夜然后进行旋转或在50 $^{\circ}$ C温度下不定期旋转1小时来确保完成DNA（团粒和涂片）的完全再水化。	<ul style="list-style-type: none"> DNA的不完全再水化可导致DNA浓度估计不准确并使下游应用（如PCR）失败。

提纯步骤	说明
15. 完全水化的DNA的储存方式： a) 要进行长期储存，建议将其等分，并存放在-20°C的TE中，或者 b) 在4°C的TE中最多可储存2个月。	<ul style="list-style-type: none"> 对提纯后的DNA在TE中进行冷冻会引起DNA沉淀。在对冷冻的提纯DNA样本进行解冻时，要特别注意再水化过程（参阅第14步的内容）。

DNA的量化

采用荧光法

要量化DNA样本中的双链DNA(dsDNA)，采用荧光染色进行定量分析比测260nm时的吸光度值的方法更为精确。我们建议采用诸如PicoGreen®或SYBR® Green I等荧光染料来量化双链DNA。这样，因RNA污染而造成的干扰会更少。PD-PR-075（《采用SYBR Green I染色和酶标仪 I进行DNA量化》）描述了采用SYBR Green I的费用较低的方案。也可使用市场上可买到的工具包，如Invitrogen的Quant-iT™PicoGreen dsDNA试剂盒（目录号：Q-33130）。不管采用哪种方案，我们都建议将提纯后的DNA用TE溶液按1:50的比例进行稀释，并且在定量分析中使用5μL提纯后的DNA。

采用吸光法

如果您选择采用吸光法来量化DNA，我们建议您先用RNase对提纯后的样本进行处理，从而消解污染的RNA，然后用乙醇沉淀DNA的方法来去除RNA片段。PD-PR-040（《采用双链RNase消解法去除RNA》）中对此方案有详细的描述。请注意：同来自血液样本的DNA相比，来自口腔样本的DNA通常所含的RNA会略多一些。在读取吸光度之前，请确保用乙醇沉淀的DNA完全溶解。

转换系数：在260nm时吸光度为1.0相当于纯dsDNA浓度为50ng/μL（50μg/mL）。

请确保吸光度值在分光光度计的线性范围内。对于不在线性范围内的样本，在重新稀释之后再进行测量。欲获得更多信息，请参阅您的设备文件。

方法：

1. 用90μL的TE对10μL的提纯DNA（经RNase处理）进行稀释（溶液浓度为1/10）。轻轻用移液管上下混匀。等气泡消失。
2. 使用参比池（空）中的TE。
3. 测量320nm、280nm和260nm时的吸光度。
4. 通过从A₂₈₀和A₂₆₀的值中减去在320nm（A₃₂₀）时的吸光度来计算A₂₈₀和A₂₆₀的校正值。
5. 单位为ng/μL的DNA浓度=A₂₆₀校正值×10（稀释系数）×50(转换系数)。
6. A₂₆₀/A₂₈₀比率：A₂₆₀校正值除以A₂₈₀校正值。

举例：

1. 假设经测定， $A_{320}=0.025$ ， $A_{280}=0.175$ 并且 $A_{260}=0.295$
2. 未稀释样本的DNA浓度为：
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [稀释系数] $\times 50$ [转换系数]
 $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
 $= 0.270 \times 10 \times 50$
 $= 135\text{ng}/\mu\text{L}$ 或 $135\mu\text{g}/\text{mL}$
3. A_{260}/A_{280} 的校正比率为：
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.296 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

参考文献

- 1 采用荧光/脱氧核糖核酸酶 (F/D) 分析法进行 DNA 量化。替代方法：采用 SYBR Green I 染色和酶标仪进行 DNA 量化。DNA Genotek.PD-PR-075.
- 2 采用双Rnase消解法去除RNA.DNA Genotek. PD-PR-040.

周一到周五（美国东部标准时间 **9:00 – 17:00**）可通过以下方式获得技术支持：

- 免费电话（南美洲）：1.866.813.6354，按 6
- 其他国家：613.723.5757，按 6
- 电子邮件：support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA 和 ORAcollect®-DNA 没有在美国销售。

Oragene®-DISCOVER 只用于研究，不得用于诊断。有些地区可能无法购买部分 DNA Genotek 产品。

*Oragene、prepIT 和 ORAcollect 是 DNA Genotek Inc. 的注册商标。本文件提及的所有其他品牌和名称均为各自所有者的财产。

所有的 DNA Genotek 方案、白皮书和应用说明均可在我们网站 (www.dnagenotek.com) 的“支持”部分获得。

