

基因组 DNA 小量提取试剂盒

本试剂盒用于从各种动植物的细胞、组织、酵母或口腔拭子中分离纯化高纯度的基因组 DNA。试剂盒利用高效的裂解液，配合蛋白酶 K 和独特的 DNA 制备柱达到纯化基因组 DNA 的目的。其产物可直接用于 PCR、Southern 分析、RAPD、AFLP 等多种分子生物学实验。

Cat.	EK01504	EK01505	EK01525
制备次数	4 tests	50 tests	250 tests
gDNA column	4	50	250
2ml Collection tube	8	100	500
1.5ml Collection tube	4	50	250
RNase A	10 µl	60 µl	300 µl
Tissue lysis buffer A	1 ml	9 ml	45 ml
Tissue lysis buffer B	2 ml	20 ml	100 ml
Proteinase K	1.8 mg	22 mg	220 mg
Proteinase K diluent	100 µl	1.2 ml	12ml
Wash buffer A	2.8 ml	28 ml	135 ml
Wash buffer B	2.4 ml	24 ml	72 ml×2
Eluent solution	1 ml	12 ml	100 ml

保存与运输:

1. 本试剂盒可以在室温下（15℃-25℃）运输。
2. 试剂盒中的 Proteinase K 粉末可以在室温条件下贮存 6 个月，长期保存请置于 4℃。溶解后，在 4℃ 条件下可以保存 2 个月，请勿长时间置于室温条件。

使用前的准备事项:

1. 将装有 Proteinase K 的离心管 12000rpm 离心 1min，使粉末处于离心管底部，再根据离心管或试剂瓶标签提示，将 Proteinase K 溶解于 Proteinase K diluent 中，请勿漩涡振荡。
2. 准备 56℃ 水浴和 PBS 溶液。PBS (phosphate buffered saline)，在 800ml 去离子水中加入：8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄，用盐酸调节 pH 至 7.4，用去离子水补至 1L。
3. 首次使用前，按试剂瓶上指定的体积向 Wash buffer B 中添加无水乙醇。
4. 检测 Tissue lysis buffer A 中是否有沉淀，如果有沉淀请将试剂置于 37℃ 水浴直至沉淀消失。
5. 请不要将蛋白酶 K 溶液直接加入 Tissue lysis buffer A 中
6. 试剂中含有刺激性化学试剂，操作时应佩戴手套等防护用品。

操作方法:

❖ 不同来源的抽提材料方案不同，请注意选择实验方案。

【A. 动物组织来源:】

1.A 取 1-20 mg 动物或人组织，移入冰水浴预冷的研钵中，快速、用力研磨成匀浆；

注：当使用：

- (1) 胰脏、脾脏、胸腺和淋巴等富含 DNase 的组织；
- (2) 皮肤、肌腱等富含胶原蛋白的组织；

(3) 骨骼等坚硬组织或其他富含角蛋白的组织;

时, 请向组织中加入液氮, 再将组织研磨至粉末后, 将研钵置于 56℃ 水浴, 待组织粉末融化时继续研磨 1min。

2.A 加入 350μl PBS 和 0.9μl RNase A, 温和的研磨 30sec;

3.A 收集 350μl 研磨好的组织至 2.0ml Collection tube, 如果体积不足 350μl, 请加 PBS 补足 350μl;

4.A 加入 150μl Tissue lysis buffer A 和 20μl 的 Proteinase K solution, 立即漩涡振荡 1min, 短暂离心后, 将 2.0ml Collection tube 置于 56℃ 水浴 10min;

注: 请不要将 Proteinase K solution 直接加到 Tissue lysis buffer A 中。

5.A 加入 350μl Tissue lysis buffer B, 漩涡振荡 30sec, 12000rpm 离心 10min。

请跳过下面的描述, 直接进入步骤 6 的操作。

【B. 植物组织、植物细胞来源:】

1.B 请取用适量的植物组织(花、叶等 10-100mg, 根、茎或种子 ≤240mg), 剪成小块放于研钵, 加液氮, 研磨成粉末后, 将研钵置于 56℃ 水浴, 待组织粉末融化。

收集 2×10^3 - 1×10^7 培养的植物细胞, 10000rpm 离心 1min, 弃上清, 加入 150μl PBS, 充分悬浮细胞, 转入研钵, 加液氮, 研磨成粉末后, 将研钵置于 56℃ 水浴, 待组织粉末融化。

注: 如果使用冷冻干燥的植物组织, 请将植物组织用量减半

注: 样品应充分研磨, 否则严重影响基因组 DNA 的得率。

2.B 加入 350μl PBS 和 0.9μl RNase A, 用力研磨 30sec;

注: 如果新鲜叶片的用量超过 120mg 或干植物叶片超过 60mg, 请加入 700μl PBS, 按照 2.B 操作完后, 将匀浆的样品分到 2 个 2ml 离心管中, 然后按照 3.B-5.B 的平行操作 2 管, 在步骤 6 以后, 将两管合并到一管, 以提高 DNA 的得率。

3.B 收集 350μl 研磨好的组织至 2.0ml Collection tube, 如果体积不足 350μl, 请加 PBS 补足 350μl;

4.B 加入 150μl Tissue lysis buffer A 和 20μl 的 Proteinase K solution, 立即漩涡振荡 1min, 短暂离心后, 将 2.0ml Collection tube 置于 56℃ 水浴 10min。

注: 请不要将 Proteinase K solution 直接加到 Tissue lysis buffer A 中。

注: 富含纤维的根、茎等组织或富含淀粉、蛋白的种子样品, 可延长水浴时间到 30min。

5.B 加入 350μl Tissue lysis buffer B, 漩涡振荡 30sec, 12000rpm 离心 10min。

请跳过下面的描述, 直接进入步骤 6 的操作。

【C. 哺乳动物培养细胞、淋巴细胞、骨髓、干血或骨头来源:】

① 悬浮培养的动物细胞或新鲜分离的动物组织单细胞悬液:

1.C.① 使用 2ml Collection tube 收集 1×10^3 - 2×10^6 细胞悬浮液, 2000g 离心 5min, 弃上清;

2.C.① 加入 350μl PBS 悬浮细胞;

② 单个细胞培养或 6 孔、12 孔、24 孔、96 孔细胞培养板, 淋巴细胞:

1.C.② 尽可能的吸弃培养基, 加入 350μl PBS 到每孔, 室温静置 1min;

2.C.② 使用移液器吹打几次, 转移 350μl PBS 匀浆至 2ml Collection tube, 如果匀浆体积不足 350μl, 补充 PBS 至 350μl ;

③ 骨髓:

1.C.③ 切除骨头两端, 用注射器吸取 350μl PBS 后, 从骨头一端冲出骨髓;

2.C.③ 使用移液器吹打几次, 转移 350μl PBS 匀浆至 2ml Collection tube, 如果匀浆体积不足 350μl, 补充 PBS 至 350μl ;

④ 干血:

- 1.C.④ 在干血样品中加入 350 μ l PBS, 室温静置 1min;
- 2.C.④ 用移液器吹打几次, 使干血完全溶解, 如果体积不足 350 μ l, 请补充 PBS 至 350 μ l;

⑤ 骨头:

- 1.C.⑤ 取 10-50mg 骨头, 移入冰水预冷的研钵中, 快速, 用力的研磨, 加入 350 μ l PBS, 用力研磨 30sec;
- 2.C.⑤ 用移液器吹打几次, 转移 350 μ l 匀浆至 2ml Collection tube, 如果匀浆体积不足 350 μ l, 请补充 PBS 至 350 μ l;

3.C 加入 0.8 μ l RNase A, 漩涡振荡 15sec, 室温静置 1min;

4.C 加入加入 150 μ l Tissue lysis buffer A 和 20 μ l 的 Proteinase K solution, 立即漩涡振荡 1min, 短暂离心后, 将 2.0ml Collection tube 置于 56 $^{\circ}$ C 水浴 10min.

注: 请不要将 Proteinase K solution 直接加到 Tissue lysis buffer A 中。

5.C 加入 350 μ l Tissue lysis buffer B, 漩涡振荡 30sec, 12000rpm 离心 10min.

请跳过下面的描述, 直接进入步骤 6 的操作。

【D 酵母来源:】

1.D 收集 2×10^6 - 5×10^7 个酵母细胞, 12000g 离心 1min, 弃上清, 使用 350 μ l PBS 悬浮酵母, 并转移至研钵, 加入液氮, 用力研磨成粉末(酵母细胞壁比较坚韧, 请适当延长研磨的时间和次数, 以确保充分粉碎细胞波), 将研钵放入 56 $^{\circ}$ C 水浴, 至样品溶解;

注: OD600 为 1 的酵母细胞培养基中, 酵母细胞的浓度约为 3×10^7 个/ml.

2.D 加入 1.2 μ l RNase A, 快速研磨 30sec;

3.D 转移 350 μ l 研磨好的匀浆至 2ml Collection tube, 如果匀浆体积不足 350 μ l, 请补充 PBS 至 350 μ l;

4.D 加入 150 μ l Tissue lysis buffer A 和 20 μ l 的 Proteinase K solution, 立即漩涡振荡 1min, 短暂离心后, 将 2.0ml Collection tube 置于 56 $^{\circ}$ C 水浴 10min.

注: 请不要将 Proteinase K solution 直接加到 Tissue lysis buffer A 中。

5.D 加入 350 μ l Tissue lysis buffer B, 漩涡振荡 30sec, 12000rpm 离心 10min.

请跳过下面的描述, 直接进入步骤 6 的操作。

【E 口腔拭子】

1.E 取 1 个干净的 1.5ml 离心管, 加入 350 μ l PBS

2.E 加入 0.5 μ l RNase A

3.E 将口腔拭子浸入 PBS, 静置 10min, 期间适当搅动拭子几次。

4.E 丢弃口腔拭子, 加入 150 μ l Tissue lysis buffer A 和 8 μ l 的 Proteinase K solution, 立即漩涡振荡 1min, 短暂离心后, 将 2.0ml Collection tube 置于 56 $^{\circ}$ C 水浴 10min.

注: 请不要将 Proteinase K solution 直接加到 Tissue lysis buffer A 中。

5.E 加入 350 μ l Tissue lysis buffer B, 漩涡振荡 30sec, 12000rpm 离心 10min.

步骤 6-10 为通用步骤:

6. 将 gDNA Column 置于 2ml 离心管中, 将上述方案步骤 5 中的离心上清液转移至 gDNA column 中, 12000rpm 离心 1min;

7. 弃滤液，将 gDNA column 放回 2ml Collection tube，加入 500 μ l Wash buffer A，12000rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
8. 弃滤液，将 gDNA column 放回 2ml Collection tube，加入 700 μ l Wash buffer B，12000rpm 离心 1 分钟，弃滤液；以同样方法再用 700 μ l Wash buffer B 洗涤一次，弃滤液。

注：请确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。

9. 重新将 gDNA column 置于 2ml Collection tube 上，12000rpm 离心 2 分钟，除尽残留洗液。
10. 将 gDNA column 置于新的 1.5ml Collection tube 上，在膜的中央处加入 100 μ l-200 μ l Eluent solution，室温静置 1 分钟。12000rpm 离心 1 分钟，洗脱基因组 DNA。

注：将 Eluent solution 加热至 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。