

## 通用 DNA 提取试剂盒

(硅胶膜离心柱法)

货号/规格: N1211/24 次, N1212/100 次

### 产品简介

本产品采用柱式纯化技术, 适合于从动物组织、深加工动物源样品、培养细胞、脱落细胞、血液、唾液、拭子、血斑、细菌等样品中提取高纯度 DNA。纯化原理是利用细胞裂解液裂解细胞核释放基因组 DNA, 由硅胶膜柱可逆吸附体系中的基因组 DNA, 经蛋白酶 K 消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质, 用纯化液洗脱获得基因组 DNA。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, 消化后的提取过程只需 20 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, 定量 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测、二代测序等实验。

### 产品组分

组分	N1211	N1212
Buffer ATL	10 ml	30 ml
Buffer AL	10 ml	30 ml
Buffer SW1	20 ml	60 ml
Buffer SW2*	6 ml	25 ml
Proteinase K Solution	0.6 ml	2.5 ml
Elution Buffer	10 ml	20 ml
DNA 纯化柱	24 个	100 个
收集管	24 个	100 个

\* Buffer SW2 需要自行添加乙醇, 按标签所示加入 4 倍体积的无水乙醇, 充分混匀后再使用, 室温保存。

### 保存条件

本产品室温(15~25°C)可保存 18 个月。低温下 Buffer ATL 可能会析出沉淀, 55°C 温育溶解后颠倒混匀后使用。本产品采用材质为 PET 的试剂瓶, 不能高温高压灭菌和超过 55°C 直接温育。

### 操作步骤

#### A. 固体组织类样品(不超过 50mg)

1. 把样品剪切成小碎片并转移至 1.5ml 离心管中。加入 250 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K Solution, 55°C 振荡温浴 30~120 分钟或直到样品完全消化。

- 正确的组织用量才能获得理想结果, 过多样品会降低产量和纯度。脾脏和胸腺富含 DNA, 不要超过 10mg。肝脏、肾脏、肺等组织不超过 20mg, 肌肉和皮肤可用到 50mg 以提高 DNA 产量。小鼠尾巴最大用量为 1.2cm, 大鼠尾巴最大用量为 0.6cm。处理乙醇浸泡保存样品, 用灭菌水清洗或晾干后进行操作。

- 把组织块尽量切成小碎片可缩短消化时间。液氮研磨、玻璃匀浆器处理可达到缩短消化时间的目的。消化时间取决于样品类型和匀浆效果。一般组织样品需 0.5~2 小时, 老鼠尾巴需 2~4 小时, 55°C 温育过夜没有负面影响。

- 处理加工的动物源样品, 如腊肉、肉松、皮革等样品, 取 30~100mg 样品, 在适量的 PBS 或生理盐水剪碎或研磨, 2,500 x g 离心 5~10 分钟得细胞沉淀, 去除废液中的油脂或添加物。由于加工后动物源样品中含有添加物不同, 可根据实际情况用 PBS、生理盐水、乙醇、氯仿等试剂进行清洗, 最后得沉淀后再加入 250~500 $\mu$ l ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K Solution, 55°C 消化过夜。

- 处理毛发、羽毛、指甲等样品, 消化时再加入 10 $\mu$ l 1M DTT 辅助消化。
- 去除 RNA: 加入 5 $\mu$ l RNase Solution 至消化液中, 混匀后室温放置 10-15 分钟。
- 去除未消化杂质: 若消化液不透亮或存在颗粒物, 13,000 x g 离心 3 分钟, 转移上清液至新的离心管中。

2. 加入 250 $\mu$ l Buffer AL, 涡旋混匀 10 秒, 70°C 温浴 10 分钟。

- 若消化液不粘稠, 可以省略温浴步骤。Buffer AL 和无水乙醇可以预混后一起加入以简化操作。

3. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇, 涡旋混匀 15 秒, 按第 5 步进行操作。

- 处理富集 DNA 样品(肝脏或脾脏), 加入无水乙醇可能会有沉淀形成, 属正常现象。

#### B. 细胞类样品(不超过 5 x 10<sup>6</sup>)

1. 取适量细胞培养液、羊水、尿液、肺泡灌洗液等体液至离心管中, 2,000 x g 离心 10 分钟收集细胞。小心吸弃培养液, 余下 100 $\mu$ l 残液和细胞沉淀, 涡旋或弹打松散细胞。

- 体液用量取决于样品类型, 5-15ml 羊水, 10-50ml 尿液。肺泡灌洗液含有痰液, 先用 1% DTT 溶液使之充分液体再进行离心操作。

2. 加入 150 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K Solution 至样品中, 涡旋混匀。55°C 温浴 10~30 分钟。

- 去除 RNA: 加入 5 $\mu$ l RNase Solution, 混匀。室温放置 10-15 分钟。

3. 加入 250 $\mu$ l Buffer AL 至样品中, 涡旋 5 秒。70°C 温浴 10 分钟。

- 若消化液不粘稠，可以省略温浴步骤。*Buffer AL* 和无水乙醇可以预混后一起加入以简化操作。

4. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至样品中，涡旋 5 秒，按第 5 步进行操作。

#### C. 血液/唾液等液体样品(250 $\mu$ l)

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 20 $\mu$ l *Proteinase K Solution* 和 250 $\mu$ l 血液、血浆、细胞悬液，唾液、拭子浸泡液等样品。

- 红细胞带核血液：鸟类/鱼类等非哺乳类动物血液的红细胞是带核的，其 DNA 含量极为丰富。在 1.5ml 离心管中，加入 10~50 $\mu$ l 抗凝血液，用 *Buffer PBS* 或生理盐水稀释至 250  $\mu$ l。

- 凝固血块：用电动/玻璃匀浆器或其它方法将凝血块匀浆成均一的液体。

- 血液和体液：处理人血液黄层/淋巴细胞等浓缩样品，浓缩前全血不要超过 1ml，太多淋巴细胞会造成裂解液太粘稠而影响提取。其它哺乳动物血液建议先用 150 $\mu$ l，用灭菌水补至 250  $\mu$ l。若血液或体液样品不足 250  $\mu$ l 时，用灭菌水补足 250  $\mu$ l。

2. 加入 250 $\mu$ l *Buffer AL*，上下翻转 5-10 次，涡旋 10 秒。70 $^{\circ}$ C 振荡温浴 10 分钟。

- 充分混匀非常重要。处理粘稠样品时，先上下翻转数次后再涡旋并达到旋涡效果。恒温金属浴速度调至 800-1500rpm。水浴温育时，温浴期间颠倒翻转 2 次以加速消化。

3. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇，涡旋 10 秒。按第 5 步进行操作。

#### D. 血斑、精斑样品

1. 用打孔器从干血片中切出 3~5 片直径为 3mm 的圆片，转移至 2.0ml 离心管中。加入 300 $\mu$ l *Buffer ATL* 和 20 $\mu$ l *Proteinase K Solution*，55 $^{\circ}$ C 振荡（1200~1400rpm）温育 60 分钟。

- 处理更多血片时，要相应加大 *Buffer ATL* 和 *Proteinase K Solution* 用量，充分振荡是产量的关键。处理精斑样品时，加入 10 $\mu$ l 1M DTT 辅助消化。

2. 加入 200 $\mu$ l *Buffer AL* 至样品中，70 $^{\circ}$ C 振荡（1200~1400rpm）15 分钟。

3. 13,000 x g 离心 1 分钟收集管壁上的液滴。转移 450~500 $\mu$ l 消化液至 1.5ml 离心管中。

4. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇，涡旋混匀 5 秒。按第 5 步进行操作。

#### E: 细菌（不超过 2 $\times$ 10<sup>9</sup> 个细菌）

1. 取适量细菌培养液、尿液、匀浆液、拭子浸泡液、食物发酵液等样品至离心管中，10,000 x g 离心 3 分钟收集细菌，小心吸弃上清液。

- 革兰氏阴性细菌：细菌沉淀用灭菌水或 *TE* 重悬，或直接取 300 $\mu$ l 菌液或液体样品，按第 2 步进行操作。

- 革兰氏阳性细菌：细菌沉淀中用 300 $\mu$ l *Buffer TE* 和 10 $\mu$ l *Lysozyme*(100mg/ml) 涡旋重悬；液体样品直接取 300 $\mu$ l 并加入 10 $\mu$ l *Lysozyme*(100mg/ml) 混匀。室温放置 15 分钟。

2. 加入 200 $\mu$ l *Buffer AL* 和 20 $\mu$ l *Proteinase K Solution*，涡旋 10 秒，65 $^{\circ}$ C 温浴 20 分钟。

- 若消化液不透亮或存在明显的颗粒，10,000 x g 离心 1 分钟去除未消化杂质。

- 去除 RNA：加入 5 $\mu$ l *RNase Solution* 混匀。室温放置 10-15 分钟。

3. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇，涡旋混匀 5 秒。按第 5 步进行操作。

#### F: 酵母（不超过 1 $\times$ 10<sup>7</sup>）

1. 取适量的酵母培养液至离心管中，10,000 x g 离心 1 分钟收集细胞，小心吸弃上清液。加入 300 $\mu$ l *Buffer ATL* 和 300mg 酸性玻璃珠(0.4-0.5mm)，高速涡旋 10 分钟。

- 去除 RNA：加入 5 $\mu$ l *RNase Solution* 混匀。室温放置 10-15 分钟。

2. 10,000 x g 离心 1 分钟，转移 250 $\mu$ l 匀浆液至新的离心管中。

3. 加入 250 $\mu$ l *Buffer AL* 和 20 $\mu$ l *Proteinase K Solution* 至样品中，涡旋 5 秒。70 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟。

4. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 5 秒。按第 5 步进行操作。

#### 过柱纯化

5. 把纯化柱装在 2ml 收集管中。转移混合液(包括沉淀)至柱子。12,000 x g 离心 1 分钟。

- 堵柱：若这一步产生堵柱现象，增加离心速度至 15,000 x g。下次实验前调整样品用量或加入乙醇前，增加离心步骤去除未消化的样品。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l *Buffer SW1*。12,000 x g 离心 1 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 750 $\mu$ l *Buffer SW2* 至柱子中。12,000 x g 离心 1 分钟。

- 处理低核酸含量的样品时，得到的 DNA 浓度低于 50ng/ $\mu$ l，建议把 *Buffer SW2* 分成两次清洗，每次用 500 $\mu$ l，可以稳定 A260/230 比值。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

9. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。向纯化柱膜上滴入 50~100 $\mu$ l *Elution Buffer*，室温放置 3 分钟，12,000 x g 离心 1 分钟。

10. 向纯化柱再滴入 50~100 $\mu$ l *Elution Buffer*，室温放置 3 分钟。12,000 x g 离心 1 分钟。

11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于 -20 $^{\circ}$ C。

本品仅供科学研究使用。