

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒

(离心柱型)

| 产品编号 | 规格 |
|------------|-------|
| 021603-10 | 10 次 |
| 021603-50 | 50 次 |
| 021603-100 | 100 次 |

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心柱和独特的缓冲液系统，提取多种动物（软体动物、水产动物、哺乳动物、节肢类动物、昆虫等）组织\细胞中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基材料为本公司特有新型材料，能够高效、专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。

一、试剂盒组成、储存条件

| 试剂盒组成 | 021603-10 | 021603-50 | 021603-100 | 保存 |
|-----------------|-----------|-------------|-------------|------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 100 次 | |
| 蛋白酶 K (20mg/ml) | 1mL/支×1 支 | 1mL/支×1 支 | 2mL/支×1 支 | -20℃ |
| 样品处理液 (ETB) | 3mL/瓶×1 瓶 | 15mL/瓶×1 瓶 | 30mL/瓶×1 瓶 | 室温 |
| 裂解液(Buffer ATL) | 5mL/瓶×1 瓶 | 20 mL/瓶×1 瓶 | 40mL/瓶×1 瓶 | 室温 |
| 洗液 1 (DW1) | 6mL/瓶×1 瓶 | 33mL/瓶×1 瓶 | 66 mL/瓶×1 瓶 | 室温 |
| 洗液 2 (DW2) | 2mL/瓶×1 瓶 | 10mL/瓶×1 瓶 | 18mL/瓶×1 瓶 | 室温 |
| Buffer DE | 1mL/支×1 支 | 10 mL/瓶×1 瓶 | 10 mL/瓶×1 瓶 | 室温 |
| 离心柱 | 10 个 | 50 个 | 100 个 | 室温 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | 1 份 | 室温 |

*需要但未提供的试剂：无水乙醇、RNaseA (25mg/mL)

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时，若裂解液 (Buffer ATL) 产生沉淀，请先将裂解液 (Buffer ATL) 室温 (20-30℃) 条件下放置一段时间，必要时可放 37℃ 水浴中温浴 10 min，以溶解沉淀。蛋白酶 K 收到后请立即使用或放于 -20℃ 下保存，室温放置半年有效。

二、实验前准备

- 56℃ 水浴锅或恒温金属浴、涡旋振荡器、掌心离心机、组织研磨仪
- 蛋白酶 K 溶液需保存 -20℃，从冰箱中取出解冻，反复冻融降低蛋白酶 K 活性。
- 使用前，请按下表准确加入 98-100% 的乙醇。

| | 10T | 50T | 100T |
|------------|-----|------|------|
| 洗液 1 (DW1) | 6mL | 33mL | 66mL |
| 乙醇 | 4mL | 20mL | 40mL |

| | 10T | 50T | 100T |
|------------|-----|------|------|
| 洗液 2 (DW2) | 2mL | 10mL | 18mL |
| 乙醇 | 8mL | 40mL | 42mL |

三、操作步骤 A（离心法）

使用前请先在洗液1（DW1）和洗液2（DW2）中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1、组织样本前处理

- a. 动物肌肉组织，动物内脏之类的样本，烘干后研磨或直接在液氮中研磨成粉末待用。
- b. 鼠尾样本，可以剪取一定长度的鼠尾，一般大鼠 3mm，小鼠 6mm，然后再烘干研磨或者直接在液氮中研磨成粉末待用。
- c. 鱼鳍样本，可以直接将新鲜的鱼鳍剪碎后待用，也可以将鱼鳍烘干后，剪取 4mm*4mm 大小的鱼鳍，然后再剪碎后待用。

2、组织消化处理

- a. 称取 25-30mg 上述前处理后的组织样本到 1.5mL 无菌离心管。
- b. 加入 300 μ L 样品处理液 ETB 和 20 μ L 的蛋白酶 K，充分振荡混匀，可以用移液器吹打混匀。
- c. 将离心管放入 56 $^{\circ}$ C 的金属浴或水浴中，温浴 30min（鼠尾和鱼鳍样本可以延长至 1-2h），期间每隔 10min 上下颠倒离心管几次。
- d. （可选）温浴完成后，加 2 μ L 的 RNaseA（25mg/ml；用户自备），混匀静置 5min。

RNA 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 RNA，需较长的消化时间。

2. （可选）12,000 \times g 离心 3 分钟，转移上清液至新的 1.5mL 离心管中。

若消化液比较浑浊或存在明显的颗粒，不要省略此步。

3. 加入 350 μ L 裂解液 ATL，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 min，溶液应变清亮，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。
4. 加入 350 μ L 无水乙醇，充分振荡混匀 15 sec，此时可能会出现絮状沉淀（絮状物为析出的 DNA），瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。
5. 吸取 650 μ L 混合液到离心柱上，12000 rpm 离心 1 min，弃掉收集管中的废液，将离心柱放回收集管中。
6. 将剩下的混合液全部转移到离心柱上，12000 rpm 离心 1 min，弃掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。
7. 向离心柱中加入 500 μ L 洗液 1 (DW1)（请检查是否已经加入无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。**再重复此步骤 7 一次。**
8. 向离心柱中加入 500 μ L 洗液 2 (DW2)（请检查是否已经加入无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。**再重复此步骤 8 一次。**
9. 12000 rpm 空离心 3 min，使吸附膜完全变干。
10. 将离心柱放置到新的 1.5 mL 收集管上，向离心柱中央加入 50~100 μ L 的 Buffer DE，盖好盖子，室温放置 3 min。
11. 12000 rpm 离心 2 min，将所得的核酸放置 -20 $^{\circ}$ C 保存或立即使用。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ L，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入离心柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 2 min。

五、操作步骤 B（负压法）

步骤 1-4 同离心法。

5. 将离心柱连到负压装置（如真空抽滤盒）上，将第4步获得的溶液转移到离心柱中，开启并调节负压至800mba，缓慢吸走液体。
6. 向离心柱依次加入500μL洗液1(DW1)、600μL洗液2(DW2)，使用负压装置使得液体通过离心柱。
7. 干抽2min，使得离心柱上的乙醇挥发完全，然后关掉负压装置；
8. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100μL的Buffer DE，盖好盖子，室温放置3 min。
9. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20℃保存或立即使用。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

| 现象 | 原因及解决方法 |
|------------------------------------|--|
| DNA 降解 | |
| 电泳条带涂抹 | 处理过程中，使用无 RNase&DNase 的耗材，样品保证新鲜，避免反复冻融造成样品的降解。 |
| DNA 产量低 | |
| 组织裂解不彻底 | 增加蛋白酶 K 的用量或组织样品减少或尽量将样品粉碎成小块 |
| 水产动物组织 DNA 电泳堵孔 | 水产动物组织（多糖、多酚），请使用我们的磁珠 DNA 纯化试剂盒，对基因组 DNA 进行纯化回收，此类样品不可避免。 |
| 洗脱效率不够 | 增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。 |
| RNA 污染 | |
| 延长 RNASE 消化时间 | 加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染 |
| OD260/280 或 OD260/230 比值不正常 | |
| RNA 污染 | 加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染 |
| 核酸浓度太低 | 核酸浓度很低时，OD 比值偏差较大 |