

## 组织/细胞基因组DNA快速提取试剂盒

货号：DD106-01

规格：50次

保存：15-25 °C

### 【产品概述】

本产品独特的结合液/蛋白酶K迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，基因组DNA在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，在低盐洗脱缓冲液作用下得到纯净的基因组DNA。

### 【产品组分】

货号	组分	体积
DD106-101	平衡液	5 ml
DD106-102	裂解液TL	11 ml
DD106-103	结合液CB	11 ml
DD106-104	抑制物去除液IR	25 ml
DD106-105	漂洗液WB（首次使用前按说明加指定量无水乙醇）	13 ml
DD106-106	洗脱缓冲液EB	15 ml
DD106-107	蛋白酶K溶液（可选）20mg/ml	1 ml
DD106-108	吸附柱&收集管	50套

### 【保存条件】

室温（15-25°C）保存，保质期一年。

注意事项：

- （1）结合液CB或者抑制物去除液IR低温时可能出现析出和沉淀，在37°C水浴几分钟重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- （2）蛋白酶K保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输，收到后，不超过25°C室温至少保存6个月，4°C保存12个月，-20°C保存2年。

### 【产品特点】

1. 本产品不需要使用苯酚，不需要乙醇沉淀。
2. 快速，简捷，单个样品操作30分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度， $OD_{260}/OD_{280}$ 比值达1.7~1.9，长度可达30kb -50kb，可直接用于PCR，Southern-blot和各种酶切反应。

### 【实验准备】

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的台式离心机。
2. 需要自备1XPBS(磷酸盐缓冲液)和异丙醇。
3. 实验前将水浴先预热到70°C备用。
4. 结合液CB和抑制物去除液IR中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
5. 洗脱液EB不含有螯合剂EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保批pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱DNA应该保存在-20°C。DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

## 【操作步骤】

**提示：**（1）首次使用前请在漂洗液WB中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标注，以免重复。

（2）平衡液预处理吸附柱备用：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取100  $\mu$  l的平衡液至柱子中。13000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。

### 1. 组织培养细胞

- 收集约 $10^5$ - $10^6$ 悬浮细胞到一个1.5ml离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- 13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团和大约10-20  $\mu$  l残留的液体。
- 加200  $\mu$  l 1XPBS重悬洗涤细胞，13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，将细胞沉淀重悬于180  $\mu$  l 1XPBS中。
- 加入20  $\mu$  l蛋白酶K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入200  $\mu$  l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在70°C放置10分钟。  
可选步骤：如果RNA残留较多，需要去除RNA，可以在加入200  $\mu$  l结合液CB前加20  $\mu$  l RNase A (25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。
- 冷却后加100  $\mu$  l异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
- 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。
- 接操作步骤项下4。

### 2. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）

- 新鲜或者解冻的组织在液氮中研磨成细粉后或者用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）后取20-50mg，转入装有180  $\mu$  l组织裂解液TL的1.5ml离心管中，用大口径枪头吹打混匀。
- 加入20  $\mu$  l的蛋白酶K溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。
- 将裂解物放置在56°C水浴1-3小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。  
可选步骤：如果RNA残留较多，需要去除RNA，可在完成步骤c后加20  $\mu$  l RNase A (25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。
- 加入200  $\mu$  l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70°C放置10分钟。
- 冷却后加100  $\mu$  l异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
- 用1ml的枪头吸取混合物，将混合物加入吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

**如果有不溶组织可能堵住枪头，可将枪头在吸水纸上轻蹭去除不溶物；如果吸上来的混合物少则可以将枪头和不溶物一起弃去，该做法是为了去除不溶物，以免堵塞离心柱。**

- 接操作步骤项下4。

### 3. 动物组织（鼠尾）

- 将0.2-0.5cm的鼠尾巴尖(即20-50mg)剪碎（一定要剪0-2cm范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好），或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有180  $\mu$  l组织裂解液TL的1.5ml离心管中，用大口径枪头吹打混匀。
- 加入20  $\mu$  l的蛋白酶K(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。
- 将裂解物放置在56°C水浴3小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。  
可选步骤：如果RNA残留较多，需要去除RNA，可在完成步骤c后加20  $\mu$  l RNase A (25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。
- 用一个1ml不带针头的一次性输液器抽打裂解物2-3次。
- 加入200  $\mu$  l结合液CB和100  $\mu$  l异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀。
- 13,000rpm离心5分钟，将上清加入吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心30-60秒，倒掉收集管中的废液。
- 接操作步骤项下4。

**上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分会降低产量，如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。**

4. 加入500 μl 抑制物去除液IR, 12,000rpm 离心30秒, 弃废液。
5. 加入600 μl 漂洗液WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。
6. 加入600 μl 漂洗液WB, 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。
7. 将吸附柱AC放回空收集管中, 13,000rpm离心2分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱AC, 放入干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加100 μl 洗脱缓冲液EB (洗脱缓冲液在65-70°C水浴中预热效果更佳), 室温放置3-5分钟, 12,000rpm 离心1分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置2分钟, 12,000rpm离心1分钟。  
**洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要DNA浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于50 μl, 体积小降低DNA洗脱效率, 减少DNA产量。**
9. DNA可以存放在2-8°C, 如果要长时间存放, 请放置于-20°C。

**【常见问题及解决方案】**

问题	评论与建议
DNA产量低	<p>*组织块太大, 蛋白酶K消化不完全-<b>建议</b>: 液氮研磨或者尽量将组织切成小块, 或者延长蛋白酶K消化时间至过夜或者在原有消化基础上另加20μl蛋白酶K消化1-2小时。</p> <p>*蛋白酶K失效了-<b>建议</b>: 收到蛋白酶K后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-<b>建议</b>: 加入结合液后, 和加入蛋白酶K后立即吹打或者涡旋混匀; 加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱, 如果太粘稠必须涡旋振荡15秒充分混匀。</p>
组织DNA降解了	<p>*组织中核酸酶活性导致降解-<b>建议</b>: 样品处理前妥善保存在-20°C, 处理量不要过量。</p>
未提取到DNA	<p>*漂洗液WB中忘记加无水乙醇-<b>建议</b>: <b>第一次实验时, 在漂洗液WB中加入指定量无水乙醇。</b></p>
洗脱下来的DNA产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-<b>建议</b>: 确保做了步骤7, 否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-<b>建议</b>: 仔细阅读仔细阅读注意事项5和步骤8和只使用洗脱缓冲液EB洗脱。</p>
A <sub>260</sub> 吸光值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了吸光值-<b>建议</b>: 将洗脱的基因组DNA溶液13,000rpm再离心一分钟, 小心取上清使用。</p>
DNA下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应-<b>建议</b>: 将洗脱的基因组DNA溶液13,000rpm再离心一分钟, 小心取上清使用。</p> <p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-<b>建议</b>: 确保做了步骤7, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。</p>

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。