

## 全血/组织/细胞基因组DNA快速提取试剂盒

货号：DD105-01

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
DD105-101	平衡液	5 ml
DD105-102	裂解液TL	11 ml
DD105-103	缓冲液BB	10 ml
DD105-104	结合液CB	15 ml
DD105-105	抑制物去除液IR	25 ml
DD105-106	漂洗液WB（首次使用前按说明加指定量无水乙醇）	15 ml
DD105-107	洗脱缓冲液EB	15 ml
DD105-108	蛋白酶K溶液（可选）20mg/ml	1 ml
DD105-109	吸附柱AC&收集管（2ml）	50套

### 【保存条件】

室温（15-25°C）保存，保质期一年。

- （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<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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。
4. 200μl常规全血可提取出3-6 μg基因组DNA。

### 【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. 为了最佳效果，建议使用新鲜血液标本或者4°C存放少于3天的标本，使用反复冻融超过3次的标本，可能会降低产量。

### 【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 μl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. 全血

- a. 取200 $\mu$ l新鲜、冷冻或加入抗凝剂的血液，放入1.5ml离心管。

如果全血起始量小于200 $\mu$ l，则用缓冲液BB补足到200 $\mu$ l。如果起始量介于200 $\mu$ l-300 $\mu$ l之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于300 $\mu$ l-1ml之间，则需要先进行红细胞裂解操作（见本说明书后附录）。

如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低等生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量5-20 $\mu$ l，可加缓冲液BB补足到200 $\mu$ l后进行后续步骤。

- b. 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 $^{\circ}$ C放置10分钟。溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

**可选步骤，一般不需要：**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。

- c. 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。

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。

- d. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

- e. 接操作步骤第5-10项。

## 2. 组织培养细胞

- a. 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。

- b. 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。

- c. 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。

- d. 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 $^{\circ}$ 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。

- e. 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。

- f. 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。

- g. 接操作步骤第5-10项。

## 3. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）

- a. 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（切成微块可以提高产量）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。

- b. 加入20 $\mu$ l的蛋白酶K溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

- c. 将裂解物放置在55 $^{\circ}$ 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。

- d. 加入200 $\mu$ l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，70 $^{\circ}$ C放置10分钟。

- e. 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。

- f. 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。

**如果有不溶组织物可能堵住枪头，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。**

- g. 接操作步骤第5-10项。

#### 4. 动物组织（鼠尾）

- a. 将0.2-0.5cm的鼠尾尖(即20-50mg)剪碎（一定要剪0-2cm范围内的尾尖，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。
- b. 加入20  $\mu$ l的蛋白酶K (20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。
- c. 将裂解物放置在55°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。
- d. 用一个1ml不带针头的一次性输液器抽打裂解物2-3次。
- e. 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。
- f. 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。
- g. 接操作步骤第5-10项。

**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。**

5. 加入500  $\mu$ l抑制物去除液IR，12,000rpm 离心30秒，弃废液。
6. 加入600  $\mu$ l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。
7. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB，12,000rpm 离心30秒，弃掉废液。
8. 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。
9. 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  $\mu$ l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  $\mu$ l，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。**
10. DNA可以存放在2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在一20°C。

#### 附录（以300 $\mu$ l，1ml全血举例红细胞裂解操作）：

1. 吸取900  $\mu$ l红细胞裂解液到一个1.5ml离心管或者3ml红细胞裂解液到一个15ml离心管。（红细胞裂解液可向本公司购买）
2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取300  $\mu$ l全血和1ml全血分别加到上述1.5ml和15ml离心管中，颠倒6-8次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。
3. 室温放置10分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次，帮助裂解红细胞）。
4. 12,000 rpm离心20秒（1.5ml离心管），2,000-3,000 rpm离心5分钟（15ml离心管），倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约10  $\mu$ l的残留上清。  
**离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复3，4。**
5. 加入200  $\mu$ l缓冲液BB涡旋振荡重悬白细胞团，充分分散白细胞团。  
**其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响后续实验裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。**
6. 此时可以按照操作提取全血基因组DNA了。

#### 【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。