
动物组织/细胞基因组DNA提取试剂盒 Animal Cell/Tissue Genome Extraction Kit

产品编号: C6207

保存条件: 室温干燥可保存一年。

产品介绍: **产品简介**

本试剂盒适合于从新鲜或冷冻的动物组织（比如鼠尾、肝脏等），细胞，血液，细菌等多种样品中提取高纯度总DNA。本品可纯化获得分子量最大为50kb的DNA片段，纯化过程不需要使用苯酚或氯仿等有毒溶剂，无需乙醇沉淀。本试剂盒采用优化的缓冲体系使裂解液中的DNA高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，PCR和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可得到高纯度DNA。纯化得到的DNA可以直接用于酶切，PCR，Real-Time PCR，文库构建，Southern Blot，分子标记等下游实验。

产品组份

Buffer GTL: 12 ml (50T)

Buffer GL: 12 ml (50T)

Buffer GW1 (concentrate) : 13 ml (50T)

Buffer GW2 (concentrate) : 15 ml (50T)

Buffer GE: 7 ml (50T)

Proteinase K** : 1 ml (50T)

Spin Columns DM with Collection Tubes: 50个 (50T)

** Proteinase K (蛋白酶K) : -20°C保存，开盖后防止空气及枪头污染，如果出现絮状物，是因为溶解缓冲液中的钙离子在磷酸盐中可能会产生不溶性沉淀，离心取上清，不影响使用效果。

自备试剂

无水乙醇；Enzymatic Lysis Buffer（提取革兰氏阳性菌基因组DNA时须准备）。

Enzymatic Lysis Buffer 配方：20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100; 终浓度为20mg/ml的Lysozyme（溶菌酶）。

实验前准备及重要注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取DNA片段较小且提取量下降。
2. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。

3. 第一次使用前应按试剂瓶标签的说明在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查Buffer GTL和Buffer GL是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将Buffer GL和Buffer GTL于56°C水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对RNA污染比较敏感，可以在加入Buffer GL前加入4μl DNase-Free的RNase A (100mg/ml)，RNase A本试剂盒并未提供，可单独订购。

操作步骤

血液及细胞样本基因组提取

1. 材料处理

- a) 如果提取材料为哺乳动物抗凝血液（无核红细胞），可直接向50-200μl新鲜或冷冻的抗凝血液样品中加入Buffer GTL补足至200μl。
- b) 如果提取材料为禽类，鸟类，两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，取5-10μl新鲜或冷冻的抗凝血液样品，加入Buffer GTL补足至200μl。
- c) 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5×10^6 个细胞），2000 rpm (400xg) 离心5分钟，弃尽上清，加200μl GTL，振荡至样品彻底悬浮。

注意：如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4μl浓度为100mg/ml的RNase A溶液，涡旋15秒，室温放置2分钟。

2. 加入20μl Proteinase K 溶液, 混匀。

3. 加入200μl Buffer GL, 涡旋振荡充分混匀, 56°C水浴10分钟。

4. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入200μl无水乙醇, 涡旋振荡充分混匀, 短暂离心。

注意：

- 1) 加入Buffer GL和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。
- 2) 加入Buffer GL和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织在加入BufferGL和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。
5. 上一个步骤中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm（约13,400 xg）离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入500 μl Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入500 μl Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤7。
8. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
9. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入50-200μl Buffer GE或灭菌水，室温放置2-5分钟，12000 rpm 离心1分钟，收集DNA溶液，-20°C保存DNA。

注意：

- 1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。
- 2) Buffer GE在65-70°C水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 μ l BufferGE或灭菌水再次洗脱可以增加产量。
- 3) 如果要提高DNA的终浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μ l，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μ g，推荐用50 μ l Buffer GE或灭菌水洗脱。
- 4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用Buffer GE洗脱并于-20°C保存。

动物组织基因组提取

1. 材料处理：如果提取材料为动物组织，取25 mg（脾组织用量应少于10 mg）；如果材料为鼠尾，取一段长度为0.4-0.6 cm的大鼠鼠尾或两段长度为0.4-0.6 cm的小鼠鼠尾。

a. 样本进行液氮研磨或切成小块后置于1.5 ml离心管中，加入180 μ l Buffer GTL，将不同样品做好标记。

b. 若使用匀浆器处理样本，匀浆前向样本中加入不超过80 μ l Buffer GTL，匀浆后加入100 μ l Buffer GTL。

注意：1) 确保各组织的量不要超出推荐范围。2) 组织样本在加入Buffer GTL之前用液氮研磨或加入Buffer GTL用匀浆器匀浆处理，可以增加裂解效率。

2. 加入20 μ l Proteinase K，涡旋震荡使样品彻底混匀。56°C水浴，直至组织完全裂解，孵育过程中可每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样品分散。

注意：1) 不同组织消化时间不同，通常1-3小时即可完成，鼠尾需要消化6-8小时，必要时过夜消化，不会影响后续操作。2) 如果孵育和涡旋震荡后仍然有胶状物质，延长56°C孵育时间或再加入20 μ l Proteinase K消化。3) 如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ l的浓度为100mg/ml的RNase A溶液，涡旋15秒，室温放置5-10分钟。

3. 加入200 μ l Buffer GL，涡旋震荡充分混匀，70°C水浴10分钟。短暂离心后加入200 μ l无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

注意：1) 加入Buffer GL和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。2) 加入Buffer GL和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织（如脾，肺）在加入Buffer GL和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。

4. 短暂离心，将步骤3所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm（约13,400xg）离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm。离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤6。

7. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾

干。注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切，PCR等）。

8. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入50-200 μ l Buffer GE或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm 离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。2) Buffer GE在65-70 $^{\circ}$ C水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 μ l BufferGE或灭菌水再次洗脱可以增加产量。3) 如果要提高DNA的终浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μ l，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μ g，推荐用50 μ l Buffer GE或灭菌水洗脱。4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用Buffer GE洗脱并于-20 $^{\circ}$ C保存。

细菌基因组提取

1. 细菌样本预处理

1a. 革兰氏阴性菌

(1) 取细菌培养物1-5 ml（10⁶-10⁸个细胞，最多不超过2 \times 10⁹个细胞）置于离心管（自备）中，12,000 rpm（~13,400xg）离心1分钟，尽量吸净上清。

(2) 向沉淀中加入180 μ l Buffer GTL，振荡使菌体重悬。

(3) 加入20 μ l Proteinase K，涡旋混匀，56 $^{\circ}$ C孵育，直至菌体完全裂解，孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

注意：如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ l浓度为100 mg/ml的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置5-10分钟。

(4) 加入200 μ l Buffer GL，涡旋震荡混匀。

1b. 革兰氏阳性菌

(1) 取细菌培养物1-5 ml（10⁶-10⁸个细胞，最多不超过2 \times 10⁹个细胞）置于离心管（自备）中，12,000 rpm离心1分钟，尽量吸净上清。

(2) 加入180 μ l Enzymatic Lysis Buffer（自备）使菌体重悬。

(3) 37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。

(4) 加入20 μ l Proteinase K涡旋震荡，充分混匀。加入200 μ l Buffer GL，涡旋震荡混匀。56 $^{\circ}$ C孵育30分钟。

注意：1) 如果需要，95 $^{\circ}$ C孵育15分钟可以使病原体失活，但是95 $^{\circ}$ C孵育会造成一些DNA的降解。2) 如需去除RNA，可在上述步骤完成后，加入4 μ l浓度为100 mg/ml的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置5-10分钟。

2. 加入200 μ l无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

注意：加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

3. 将步骤2所得溶液（包括形成的沉淀）全部加入到已装入收集管的吸附柱

（SpinColumns DM）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

4. 向吸附柱中加入500 μl Buffer GW1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入500 μl Buffer GW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤5。

6. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

7. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入50-200 μl Buffer GE或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液， -20°C 保存DNA。

注意：

1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) Buffer GE在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 μl Buffer GE或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

3) 如果要提高DNA的终浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟；若洗脱体积小于200 μl ，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μg ，推荐用50 μl Buffer GE或灭菌水洗脱。

4) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用Buffer GE洗脱并于 -20°C 保存。