



Genomic DNA Isolation Kit

For genomic DNA purification from whole blood, serum, cultured cells, swabs, FFPE tissue, bacteria, and animal tissue

Research use only.

Store at room temperature.



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
基因组DNA的应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
产品信息	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
注意事项	6
基因组DNA提取得率和纯度	7
基因组DNA片段大小	7
操作前准备事项	8
实验材料和设备	8
自备试剂	8
安全性	8
操作指南	9
● 血液基因组DNA提取操作步骤	10
● 动物细胞基因组DNA提取操作步骤	12
● 动物组织基因组DNA提取操作步骤	13
● 石蜡包埋组织基因组DNA提取操作步骤	14
● 细菌基因组DNA提取操作步骤	16
● 其他样本基因组DNA提取操作步骤	18
DNA浓度及纯度测定	19
快速操作示意图	20
问题分析指南	21

产品介绍

由于待处理样本的来源、种类不同，使得同一个试剂盒处理起来有诸多不便，我们提供的通用型基因组 DNA 提取试剂盒可以在短时间内轻松处理各种样本，如：新鲜或冻存的血液、细菌、培养的动物细胞、动物组织以及很难处理的石蜡包埋组织等。

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心柱、全新的 Foregene Protease 以及独特的缓冲液体系，根据样品来源不同，可以在 45-75 分钟内提取到高质量的基因组 DNA。离心柱中采用的 DNA-only 硅胶膜为本公司特有新型材料，高效、专一吸附 DNA，可最大限度的去除 RNA、杂质蛋白、离子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。组织块只需 10-50mg 即可得到 5-80 μ g 基因组 DNA。

产品特点

- ◆ 无 RNA 酶污染：无需额外添加 RNA 酶即可去除基因组 DNA 中的 RNA，避免实验室遭受外源 RNA 酶污染。
- ◆ 速度快：Foregene Protease 具有比同类蛋白酶更高的活性，消化组织样本速度快；操作简单，基因组 DNA 提取操作在 45-75 分钟内即可完成。
- ◆ 方便：离心操作均在常温，无需 4 $^{\circ}$ C 低温离心或乙醇沉淀 DNA。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取获得的基因组 DNA 片段大、无 RNA、无 RNA 酶、离子含量极低，能满足各种实验的要求。

试剂盒应用

该试剂盒适用于纯化以下样本基因组 DNA：新鲜或冻存的动物组织、新鲜或抗凝冻存的全血、培养的细胞、石蜡包埋组织、培养的细菌等。

基因组 DNA 的应用

通用基因组 DNA 提取试剂盒纯化获得的基因组 DNA 纯度高，可用于常规分子生物学操作，如：酶切、PCR、Southern 杂交、文库构建等实验。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的通用基因组 DNA 提取试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Genomic DNA Isolation Kit			
通用型基因组 DNA 提取试剂盒			
试剂盒组成	DE-05011	DE-05012	DE-05013
	50 次	100 次	250 次
Buffer L1	20ml	40ml	100ml
Buffer L2	20ml	40ml	100ml
Buffer PW	25ml	50ml	125ml
Buffer WB	25ml	50ml	125ml
Buffer EB	10ml	20ml	50ml
Foregene Protease	1.25ml	2.5ml	6.5ml
离心柱	50 个	100 个	250 个
收集管	50 个	100 个	250 个
说明书	1 份	1 份	1 份

产品信息

型号	离心柱型	纯化组件	Foregene 离心柱、试剂
通量	1-24 个样品	制备时间	45-75min (24 个样品)
离心机	台式离心机	组织酶解物分离	离心分离
离心柱液体盛装量	800µl	纯化柱 DNA 承载量	80µg
最小洗脱体积	100µl	组织样本处理量	10-50mg

储存条件

- ◆ 本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2–8°C。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

- ◆ Foregene Protease 溶液具有独特配方，常温保存长期（3 个月）具有活性；在 4°C 保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4°C 保存，切记不能置于 -20°C 保存。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer L1: 提供样本酶解环境。
- ◆ Foregene Protease: 在 Buffer L1 的环境下酶解组织样本。
- ◆ Buffer L2: 失活 Foregene Protease, 并提供 DNA 上柱环境。
- ◆ Buffer PW: 去除 DNA 中的蛋白质、RNA 等杂质。
- ◆ Buffer WB: 去除 DNA 中的残留的盐离子。
- ◆ Buffer EB: 洗脱纯化柱膜上的 DNA。
- ◆ DNA-only Column: 特异吸附裂解产物中的基因组 DNA。

注意事项:(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 样品应避免反复冻融, 否则会导致提取的 DNA 片段较小且降低提取得率。
- ◆ 试剂盒使用前, 仔细检查 Buffer L1、Buffer L2 和 Buffer PW 中是否有沉淀析出, 若有沉淀析出, 请将其置于 37°C 溶解, 混匀后再使用。
- ◆ 试剂盒使用前, 请务必检查 Buffer WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前分别添加 60ml 无水乙醇(DE-05011)、120ml 无水乙醇(DE-05012)、300ml 无水乙醇(DE-05013)。
- ◆ 洗脱体积: Buffer EB 不应少于 100 μ l, 否则会影响 DNA 产量。
- ◆ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ◆ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ◆ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

基因组 DNA 提取得率和纯度

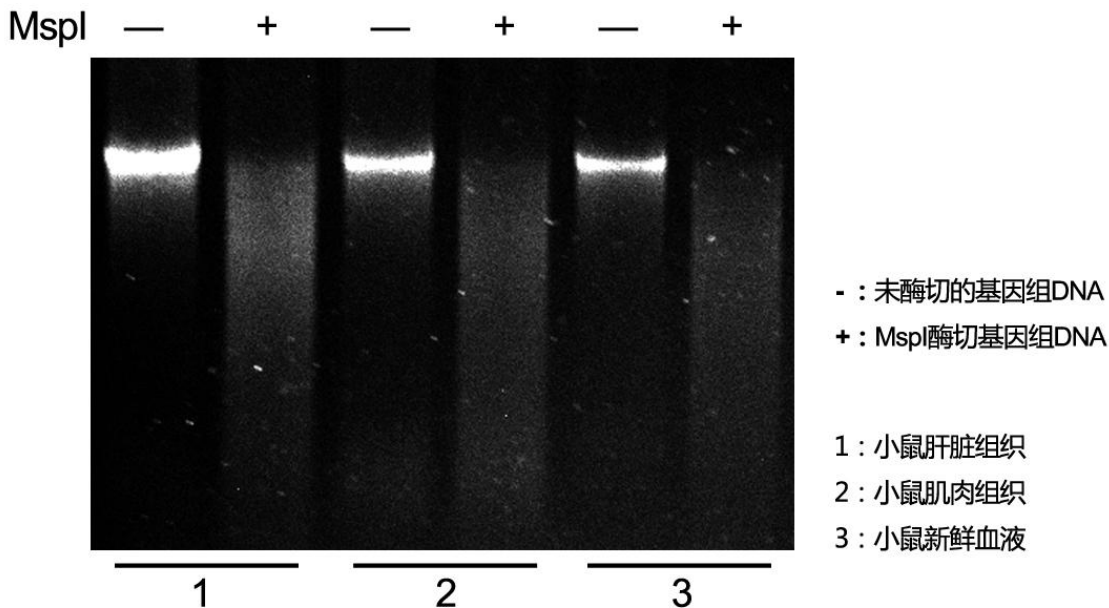
动物组织基因组 DNA 提取得率与组织的来源、保存条件、保存时间、用量等因素相关，所得基因组 DNA 纯度均满足常规分子生物学实验操作，其 OD260/280 在 1.7-1.9 之间。使用该试剂盒提取基因组 DNA 的得率见下表：

样本来源	样本用量	DNA 产量 (μg)	OD260/280
血液	100μl	2-4	1.8-1.9
细胞	10 ⁶	15-30	1.7-1.9
肝脏	10mg	4-10	1.7-1.9
心脏	10mg	2-5	1.7-1.9
脾脏	10mg	5-30	1.7-1.9
大脑	10mg	5-10	1.7-1.9

注意：此表数据仅作参考，实际操作中由于所用材料的存储条件、操作熟练度等因素影响，所得数据会与此表数据有些许出入。

基因组 DNA 片段大小

通用基因组 DNA 提取试剂盒是采用硅胶膜柱分离纯化多种样本来源的基因组 DNA，纯化获得的基因组 DNA 片段大小均在 23kb 附近。如图：



Genomic DNA Isolation Kit提取小鼠不同组织基因组DNA及MspI酶切琼脂糖凝胶电泳图

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。通用基因组 DNA 提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 多种来源的组织：10-50mg；血液：50-500 μ l，凝血块：10-50mg；细菌：0.5-3ml（培养 12-16hr）。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管。
- ◆ 无水乙醇。
- ◆ 台式离心机（ $\geq 13,400\times g$ ）、65 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴、移液器、涡旋仪等。

自备试剂

- ◆ 溶菌酶酶解反应液：20 mM Tris·HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% TritonX-100, 20mg/ml 溶菌酶（以上均为各试剂的终浓度），该试剂用于革兰氏阳性菌细菌基因组 DNA 提取样本预处理。
- ◆ PBS，该试剂用于福尔马林固定组织 DNA 提取样本预处理。
- ◆ 二甲苯，该试剂用于石蜡包埋组织基因组 DNA 提取样本预处理。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer L2、Buffer PW 含有胍盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer WB 含无水乙醇：易燃。
- ◆ Foregene Protease：增敏剂，刺激性。

操作指南

本说明书根据实验材料差异，分别提供不同组织样本的操作说明，请根据自己的样本材料选择相应的操作步骤进行基因组 DNA 提取操作。

材料取用说明

- ◆ 血液或抗凝血液：单次处理，用量请勿超过 1ml。
- ◆ 动物组织：单次处理，用量请勿超过 50mg。
- ◆ 培养细胞：单次处理，用量请勿超过 5×10^6 。
- ◆ 过夜培养细菌：单次处理，用量请勿超过 3ml。

预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了试验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材。

一、血液基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

- 新鲜血液直接进行下面样本处理步骤；冻存的血液需先解冻，再按下面步骤进行处理。
 - 无核红细胞抗凝血液：当样品体积 $<200\mu\text{l}$ 时，直接加入 Buffer L1 补齐到 $400\mu\text{l}$ ；当体积为 $200-500\mu\text{l}$ 时， $6000\times g$ 离心 1min，弃上层血清，再加入 $400\mu\text{l}$ Buffer L1，进行步骤 2。
 - 有核红细胞抗凝血液：向 1.5ml 离心管中加入 5-20 μl 抗凝血，加入 $400\mu\text{l}$ Buffer L1，进行步骤 2。
 - 哺乳动物凝血块：估计血块体积，取 100-200 μl 抗凝血液当量的血块放入 1.5ml 离心管中，用枪头尽量捣碎，加入 $400\mu\text{l}$ Buffer L1，进行步骤 2。
- 向上述混合液中加入 **20 μl** Foregene Protease，颠倒混匀，放置于 65°C 金属浴或水浴中，根据样品种类处理不同时间。
 - 无核红细胞抗凝血液：~10min。
 - 有核红细胞抗凝血液：~10min。
 - 哺乳动物凝血块：~10-30min，其间每间隔 5min 涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）以帮助血块酶解，直至溶液中无明显血块即可。

注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 秒即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。
- 酶解完成后，加入 **400 μl** Buffer L2，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 65°C 金属浴或水浴中 10min。
- 12,000 rpm (~13,400 $\times g$)离心 5-10min。
- 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），不要吸取到沉淀。

注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
- 12,000rpm(~13,400 $\times g$)离心 1min，弃掉收集管中的废液。
- 向离心柱中加入 **500 μl** Buffer PW，12,000rpm(~13,400 $\times g$)离心 1min，弃掉收集管中的废液。
- 向离心柱中加入 **700 μl** Buffer WB，12,000rpm(~13,400 $\times g$)离心 1min，弃掉收集管中的废液。
- 重复步骤 8 一次。
- 将离心柱放回收集管中，12,000rpm(~13,400 $\times g$)空管离心 2min，去掉离心柱中残

余的 Buffer WB。

11. 将离心柱移至新的 1.5ml 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已于 65°C 预热的 Buffer EB，室温放置 5min，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min。再次向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已预热的 Buffer EB，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min。将两次收集的洗脱液合并。

注意：如果希望提高DNA的浓度，可将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心1min。

二、动物细胞基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 用细胞刮刀将细胞 ($\leq 5 \times 10^6$) 从培养皿中刮下，收集于 1.5ml 干净的离心管中。
2. 1,000 \times g 离心 5min，弃除细胞培养基（可用移液器将培养基吸除干净，以免影响后续操作），加入 400 μ l Buffer L1，重悬细胞。
3. 向混合液中加入 20 μ l Foregene Protease，涡旋混匀，放置于 65°C 金属浴或水浴中 10-20min，其间可涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）以帮助细胞酶解。

注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 秒即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。

4. 酶解完成后，加入 400 μ l Buffer L2，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 65°C 金属浴或水浴中 10min。
5. 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 5-10min。
6. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），不要吸取到沉淀。
注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
7. 12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
8. 向离心柱中加入 500 μ l Buffer PW，12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
9. 向离心柱中加入 700 μ l Buffer WB，12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 将离心柱放回收集管中，12,000rpm(~13,400 \times g) 空管离心 2min，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。
12. 将离心柱移至新的 1.5ml 离心管中，向膜中央悬空滴加 100 μ l 已于 65°C 预热的 Buffer EB，室温放置 5min，12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min。再次向膜中央悬空滴加 100 μ l 已预热的 Buffer EB，12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min。将两次收集的洗脱液合并。

注意：如果希望提高 DNA 的浓度，可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min。

三、动物组织基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 称取 10-50mg 新鲜或冻存的动物组织，尽量剪碎，以便于后续酶解反应。
注意：肝脏中酶含量较高，可以将其剪碎置于预冷的研钵中，加入液氮将其研碎，迅速转移至干净的离心管中。
2. 向离心管中加入 **400 μ l Buffer L1**, **20 μ l Foregene Protease**, 涡旋混匀，放置于 **65 $^{\circ}$ C** 金属浴或水浴中约 **30min**，其间每间隔 **10min** 涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）以帮助动物组织酶解。
注意：涡旋时间不宜太长，每次 **2 秒**即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。
3. 酶解完成后，加入 **400 μ l Buffer L2**, 此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 **65 $^{\circ}$ C**金属浴或水浴中 **10min**。
4. **12,000 rpm (~13,400 \times g)**离心 **5-10min**。
5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），注意尽量不要吸到沉淀。
注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
6. **12,000rpm(~13,400 \times g)** 离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
7. 向离心柱中加入 **500 μ l Buffer PW**, **12,000rpm(~13,400 \times g)**离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
8. 向离心柱中加入 **700 μ l Buffer WB**, **12,000rpm(~13,400 \times g)**离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。
- 10.将离心柱放回收集管中，**12,000rpm(~13,400 \times g)**空管离心 **2min**，弃掉离心柱中残余的 Buffer WB。
- 11.将离心柱移至新的 **1.5ml** 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已于 **65 $^{\circ}$ C**预热的 Buffer EB，室温放置 **5min**，**12,000rpm(~13,400 \times g)** 离心 **1min**。再次向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已预热的 Buffer EB，**12,000rpm(~13,400 \times g)** 离心 **1min**。将两次收集的洗脱液合并。
注意：如果希望提高DNA的浓度，可将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中，**12,000rpm (~13,400 \times g)** 离心**1min**。

四、石蜡包埋组织基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

A、石蜡包埋组织样本预处理步骤

1. 用手术刀将组织块中多余的石蜡切掉，取 **10-50mg** 石蜡包埋组织块样品，切成小块或 5-10 μ m 的薄片，放入一个 1.5ml 离心管中。
2. 加入 **1.2ml** 二甲苯，充分涡旋混匀。
3. 13,300rpm (~17,000 \times g)离心 2min，使用移液器将上清液吸除。注意不要吸到或晃动沉淀。
4. 加入 **1.2ml** 乙醇(96-100%)充分混匀，以去除残余的二甲苯。
5. 13,300rpm (~17,000 \times g)离心 2min，使用移液器将上清液吸除。注意不要吸到或晃动沉淀。
6. 打开离心管盖，置于 37°C金属浴中 10-15min，直至乙醇挥发完全。之后进行石蜡组织基因组 DNA 提取后续操作步骤 B。

B、石蜡组织基因组DNA提取步骤

1. 在按照 A 操作预处理好的样本离心管中加入 **400 μ l** Buffer L1，**40 μ l** Foregene Protease 涡旋混匀。
2. 将离心管放置于 65°C金属浴或水浴中 2-5h，每间隔 1h 涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）。
注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 秒即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。如果酶解 5h 之后还有少许不溶固体或杂质，直接进行下一步操作。
3. 酶解完成后，加入 **400 μ l** Buffer L2，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 65°C金属浴或水浴中 10min。
4. 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 5-10min。
5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），不要吸取到固体杂质。
注意：如果吸取的上清液中还有许多固体杂质，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
6. 12,000rpm(~13,400 \times g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
7. 向离心柱中加入 **500 μ l** Buffer PW，12,000rpm (~13,400 \times g)离心 1min，弃掉收集管中的废液。

8. 向离心柱中加入 **700 μ l** Buffer WB, 12,000rpm (~13,400 \times g)离心 1min, 弃掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 将离心柱放回收集管中, 12,000rpm (~13,400 \times g) 空管离心 2min。
11. 将离心柱移至新的 1.5ml 离心管中, 向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已于 65 $^{\circ}$ C预热的 Buffer EB, 室温放置 5min, 12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min。再次向膜中央悬空滴加 **100 μ l** 已预热的 Buffer EB, 12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min。将两次收集的洗脱液合并。

注意: 如果希望提高DNA的浓度, 可将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中, 12,000rpm (~13,400 \times g) 离心1min。

五、细菌基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

A、细菌样本预处理步骤

a) 革兰氏阴性菌

1. 取 **0.5-3ml** 37°C 培养 12-16hr 革兰氏阴性菌，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，收集菌体，弃掉培养基。
2. 加入 **400µl** Buffer L1 重悬菌体（务必彻底打散混匀菌体），之后进行细菌基因组 DNA 提取后续操作步骤 **B**。

b) 革兰氏阳性菌

1. 取 **0.5-3ml** 37°C 培养 12-16hr 革兰氏阳性菌，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，收集菌体，弃掉培养基。
2. 加入 **200µl** 溶菌酶酶解反应缓冲液（含 20 mM Tris·HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% TritonX-100, 20mg/ml 溶菌酶，需自备），37°C 孵育 30min。
3. 加入 **200µl** Buffer L1，之后进行细菌基因组 DNA 提取后续操作步骤 **B**。

B、细菌基因组DNA提取步骤

1. 向按照 A 操作预处理好的样本离心管中加入 **20µl** Foregene Protease，涡旋混匀。
2. 将离心管放置于 65°C 金属浴或水浴中约 10-20min，其间每间隔 10min 可涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）以帮助细菌酶解。

注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 秒即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。

3. 酶解完成后，加入 **400µl** Buffer L2，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 65°C 金属浴或水浴中 10min。
4. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 5-10min。
5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），不要吸取到沉淀。

注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。

6. 12,000rpm(~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
7. 往离心柱中加入 **500µl** Buffer PW，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
8. 往离心柱中加入 **700µl** Buffer WB，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集

- 管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。
 10. 将离心柱放回收集管中，12,000rpm (~13,400×g)空管离心 2min，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。
 11. 将离心柱移至新的 1.5ml 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100μl** 已于 65°C预热的 Buffer EB，室温放置 5min，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min。再次向膜中央悬空滴加 **100μl** 已预热的 Buffer EB，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min。将两次收集的洗脱液合并。

注意：如果希望提高DNA的浓度，可将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中，12,000rpm (~13,400×g) 离心1min。

六、其他样本基因组 DNA 提取操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

A、样本预处理步骤

a) 福尔马林固定组织

1. 取福尔马林固定的动物组织 **10-50mg**，可用干净的吸水纸先擦拭组织表面的残留固定液，之后切成小块或 **5-10 μ m** 的薄片，放置于 **1.5ml** 干净的离心管中。
2. 加入 **1.2ml** PBS，上下颠倒洗涤组织。
3. **13,300rpm** (~17,000 \times g)离心 2min，使用移液器将上清液吸除。注意不要吸到或晃动沉淀。
4. 重复步骤 3 一次。
5. 样本处理完成后即可进行基因组 DNA 提取后续操作步骤 **B**。

b) 酒精浸泡组织

1. 取酒精浸泡的动物组织 **10-50mg**，可用干净的吸水纸先擦拭组织表面的残留酒精，之后切成小块或 **5-10 μ m** 的薄片，放置于 **1.5ml** 干净的离心管中。
2. 加入 **1.2ml** PBS 或 ddH₂O，上下颠倒洗涤组织。
3. **13,300rpm**(~17,000 \times g)离心 2min，使用移液器将上清液吸除。注意不要吸到或晃动沉淀。
4. 重复步骤 3 一次。
5. 样本处理完成后即可进行基因组 DNA 提取后续操作步骤 **B**。

c) 其他组织样本

样本只需自行预处理，即可按基因组 DNA 提取步骤 **B** 进行操作。

B、基因组DNA提取步骤

1. 向按照 A 操作预处理好的样本离心管中加入 **400 μ l** Buffer L1、**20 μ l** Foregene Protease，涡旋混匀。
2. 将混合好的离心管放置于 **65 $^{\circ}$ C**金属浴或水浴中 **10-30min**，其间每间隔 **10min** 可涡旋混匀一次（或用手指用力弹击离心管底部数次）以帮助组织酶解。

注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 秒即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。

3. 酶解完成后，加入 **400 μ l** Buffer L2，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，

置于 65°C 金属浴或水浴中 10min。

4. 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 5-10min。
5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），注意尽量不要吸到沉淀。

注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。

6. 12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
7. 往离心柱中加入 **500µl** Buffer PW，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
8. 往离心柱中加入 **700µl** Buffer WB，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min，弃掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 将离心柱放回收集管中，12,000rpm (~13,400×g) 空管离心 2min，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。
11. 将离心柱移至新的 2ml 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100µl** 已于 65°C 预热的 Buffer EB，室温放置 5min，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min。再次向膜中央悬空滴加 **100µl** 已预热的 Buffer EB，12,000rpm (~13,400×g) 离心 1min。将两次收集的洗脱液合并。

注意：如果希望提高DNA的浓度，可将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中，12,000rpm (~13,400×g) 离心1min。

DNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的基因组 DNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- ◆ DNA 的 OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA。
- ◆ DNA 的 OD₂₆₀/280 \approx 1.7-1.9。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液 Buffer EB，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

快速操作示意图



样本预处理 {

- 石蜡包埋组织
- 革兰氏阳性细菌
- 酒精浸泡组织
- 其他组织样本

样本酶解 {

- 400 μ l Buffer L1: 提供酶解环境
- 20 μ l /40 μ l Foregene Protease: 65 $^{\circ}$ C {
- 血液: ~10min
- 细胞: 10-20min
- 组织: ~30min
- 细菌: 10-20min
- 石蜡组织: 2-5hr

400 μ l Buffer L2: 65 $^{\circ}$ C ; 10min

离心: 13,400 \times g ; 5-10min (去沉淀, 上清液过柱)

吸附: 上柱吸附基因组DNA (13,400 \times g ; 1min)

洗涤1: 500 μ l Buffer PW (13,400 \times g ; 1min)
去蛋白、去RNA

洗涤2: 700 μ l Buffer WB 两次 (13,400 \times g ; 1min)
脱盐

离心: 空管离心 (13,400 \times g ; 2min)
去残留乙醇

洗脱: 100-200 μ l Buffer EB或ddH₂O (13,400 \times g ; 1min)
(添加Buffer EB后室温5min, 再离心以增加洗脱效率)

问题分析指南

以下针对组织样本基因组 DNA 提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail:

Tech@foregene.com。

低产量或无 DNA

通常有多种因素会影响基因组 DNA 产量，包括样本来源、样本保存条件、样本的预处理、操作等。

提取过程中无法获得基因组 DNA

1. 组织样本保存不当或保存时间太长，导致基因组 DNA 已经降解。
建议：组织样本保存于液氮或者 -80°C；用甲醛等溶液固定组织时应尽量缩短从样品采集到置于固定液之间的时间；尽量使用新近采集组织样本进行基因组 DNA 的提取。
2. 组织用量过少可能导致提取不到相应的基因组 DNA。
建议：对于保存时间很长或基因组 DNA 降解比较厉害的组织样本，可以适当增加组织样本的用量，以便提取获得可观的基因组 DNA。可以根据 DNA 需要确定样本的用量，但是不宜超过 50mg。
3. Foregene Protease 保存不当，导致其活性降低或失活。
建议：确认 Foregene Protease 保存条件或者更换新的 Foregene Protease 进行酶解反应。
4. 试剂盒保存不当或存放时间太长，导致试剂盒里面某些组分失效。
建议：购置新的通用型基因组 DNA 提取试剂盒进行相关操作。
5. 试剂盒使用不当，比如有些组织需要专用的试剂盒进行处理。
建议：购置样本专用的试剂盒，比如土壤基因组 DNA 的提取，需要购买专用的 Soil DNA Isolation Kit。
6. Buffer WB 没有添加无水乙醇。
建议：确认 Buffer WB 中添加正确体积的无水乙醇。

7. 洗脱液没有正确滴加到硅胶膜上。

建议：将 65°C 预热的洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

提取获得低产量基因组 DNA

1. 样本保存不当或保存时间太长，导致基因组 DNA 降解。

建议：组织样本保存于液氮或者 -80；用甲醛等溶液固定组织时应尽量缩短从样品采集到置于固定液之间的时间；尽量使用新近采集组织样本进行基因组 DNA 的提取。

2. 组织样本用量过少，提取到的基因组 DNA 含量会较少。

建议：对于保存时间过长或基因组 DNA 降解比较厉害的组织样本，可以适当增加组织样本的用量，以便提取获得可观的基因组 DNA。可以根据 DNA 需要确定样本的用量，但是不宜超过 50mg。

3. 样本用量过多，导致消化不完全，离心不彻底，上柱离心时可能堵塞纯化柱，提取获得的基因组 DNA 会较少。

建议：根据组织的不同，用量在 10-50mg 内调整，当出现消化不完全或纯化柱堵塞时，请减少相应的组织用量。

4. 样本没有进行预处理或预处理的不彻底。

建议：特殊保存的样本或者一些比较特殊的样本一定要进行酶解前预处理，这样可以去除样本保存液或影响蛋白酶活性的因子，使酶解反应进行的更彻底，提取获得更高得率的基因组 DNA。

5. 特殊的保存的组织样本，比如石蜡包埋、鼠尾等。

建议：购买专用的基因组 DNA 提取试剂盒，如石蜡包埋样本，可选购 FFPE DNA Isolation Kit；鼠尾样本，可选购 Mouse Tail DNA Mini Kit。这些组织用其专门的试剂盒处理，DNA 提取得率会更高，效果更理想。

6. Foregene Protease 保存不当，导致其活性降低或失活。

建议：确认 Foregene Protease 保存条件或者更换新的 Foregene Protease 进行酶解反应。

7. 洗脱液问题。

建议：请使用 Buffer EB 进行洗脱；如果使用 ddH₂O 或其他洗脱液，确认洗脱液的 pH 值在 7.0-8.5 之间。

8. 洗脱液没有正确滴加。

建议：请将洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 5 分钟增加洗脱效率。

9. 洗脱液体积太少。

建议：请按说明书上要求使用洗脱液进行基因组 DNA 洗脱，最少不要低于 100 μ l。

提取获得基因组 DNA 纯度低

基因组 DNA 纯度低会导致下游实验的失败或效果不理想，如：酶切不开，PCR 得不到目的基因片段等。

1. 杂蛋白污染、RNA 污染。

分析：没有使用 **Buffer PW** 洗涤纯化柱；**Buffer PW** 洗涤纯化柱没有使用正确的离心转速。

建议：在上清液过柱时尽量保证上清液中无沉淀；务必按说明书进行 **Buffer PW** 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

2. 杂质离子污染。

分析：省略了 **Buffer WB** 洗涤纯化柱或者只洗涤了一次，导致残留的离子污染。

建议：务必按说明书使用 **Buffer WB** 洗涤 2 次，以尽量去除残留的离子。

3. RNA 酶污染。

分析：**Buffer** 中添加了外源的 RNA 酶；**Buffer PW** 洗涤操作不正确，导致 RNA 酶残留，影响下游 RNA 实验操作，如：体外转录等。

建议：**Foregene** 系列核酸提取试剂盒无需额外添加 RNA 酶即可去除 RNA，**Genomic DNA Isolation Kit** 里面所有试剂均无需添加 RNA 酶；务必按说明书进行 **Buffer PW** 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

4. 乙醇残留。

分析：**Buffer WB** 洗涤纯化柱后，没有进行空管离心操作。

建议：按说明书进行正确的空管离心操作。

5. 其他杂质污染。

分析：保存样本或特殊样本没有进行预处理。

建议：按操作说明对样本进行彻底的预处理。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

