

GF-1 组织&血液 DNA 提取试剂盒说明书

版本 3.1

产品简介:

GF-1 组织&血液DNA提取试剂盒专业快速、高效纯化基因组DNA，此基因组DNA来自于多达 5×10^6 个培养的动物细胞，血液，血清，血浆和各种器官，如肾，心脏，肺，脑，肌肉，肝脏，脾脏等，而不需要进行沉淀或有机提取法。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，使用最佳缓冲液，以确保只有DNA被分离，在随后的洗涤步骤中除去细胞蛋白，代谢物，盐和其它低分子量的杂质。高纯度的基因组DNA在水或低盐缓冲液中被洗脱，其 A260/280 比值为 1.7-1.9, 用于许多常规分子生物学实验，如酶切，Southern印迹杂交，PCR，DNA指纹分析和其他操作。

试剂盒组成成份

产品目录号	5 次 样品	25 次 CN/GF- BT-025	100 次 CN/GF- BT-100	200 次 CN/GF- BT-200
组份				
GF-1 亲和柱(GF-1 columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
组织裂解液 (缓冲液 TL)	1.5ml	8ml	30ml	60ml
Tissue Lysis Buffer (Buffer TL)				
溶菌剂(Lysis Enhancer)	0.1ml	0.5ml	2ml	2 x 1.5ml
基因组 DNA 结合液 (缓冲液 CB) Genomic DNA Binding Buffer (BufferCB)	3.2ml	16ml	64ml	2 x 64ml
洗涤液 1 (浓缩液) * WashBuffer1(concentrate)*	1.5ml	7ml	30ml	2 x 30ml
洗涤液 2 (浓缩液) * WashBuffer2(concentrate)*	2.4ml	9ml	34ml	2 x 34ml
洗脱液 (Elution Buffer)	1.5ml	5ml	20ml	40ml
蛋白酶 K* (Proteinase K*)	0.11ml	0.55ml	2 x 1.05ml	4 x 1.05ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意: 标*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 组织&血液 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

注: GF-1 组织&血液DNA提取试剂盒可从多达 5×10^6 个培养的动物细胞，白细胞或 10-20mg的组织样本中最佳分离高达 20ug DNA。组织样本细胞数的不同取决于组织的年龄、类型和起源。处理样本时，起始样本数量不要超过推荐的数量，过度的细胞数量将使柱子超载，这将导致得率和纯度的降低。建议使用前称量组织样本，以确保获得最佳的产量和纯度。肝脏和脾脏的蛋白质和RNA含量都非常高，因此，当从这些来源中分离基因组DNA，样本只需 15mg。

自备材料

无水乙醇 (>95%)

RNA 酶 A (无 DNA 酶) (20mg/ml)

PBS

配制方案

贴有洗涤液 1 和洗涤液 2 标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

样品 (5 次):

在洗涤液 1 中加入 1.5ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 5.6ml 无水乙醇。

CN/GF-BT-025 (25 次)

在洗涤液 1 中加入 7ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 21ml 无水乙醇。

CN/GF-BT-100(100 次)

在洗涤液 1 中加入 30ml 无水乙醇。

在洗涤液 2 中加入 80ml 无水乙醇。

CN/GF-BT-200 (200 次)

在洗涤液 1 中加入 30ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液 1。

在洗涤液 2 中加入 80ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液 2。

洗涤液 1 和洗涤液 2 使用后拧紧瓶盖，室温保存。

储存及稳定性

- 溶液 20°C-30°C 保存。
- 蛋白酶 K -20°C 保存。
- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存18个月。缓冲液 CB 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

化学危害

缓冲液 CB 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中来即可除去胍盐。

操作步骤

提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- 洗涤液 (浓缩液) 在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照配制方案。
- 如果缓冲液 CB 出现沉淀或结晶，请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。
- 预先设定 65 °C 水浴锅。
- 65 °C 预热洗脱液。

A. 血液、血清、血浆中DNA的提取

1、血液裂解

取一个干净的微量离心管，加入 200ul 血液样本，在样本中加入 200ul 缓冲液CB，脉冲漩涡振荡混匀，加入 20ul 蛋白酶K并立即混匀。65°C 温育 10 分钟。

注: 确保在加入蛋白酶K前缓冲液CB和血液样本已混合均匀。血

液样本白细胞数量不尽相同，取决于供体。处理过多的细胞可能导致柱子超载，因此，确保样本中的白细胞数量不超过 5×10^6 个。

RNA 的去除（可选）

如果要求 DNA 中无 RNA 存在，则加入 20ul RNA 酶 A（无 DNA 酶，20mg/ml），混匀并 37℃ 温育 10 分钟。

2、进行步骤 4（加入乙醇）

B. 动物培养细胞中DNA的提取

1、离心和重新悬浮

取合适数量的细胞（不超过 5×10^6 个）放入一个干净的微量离心管中，4℃ 800 x g (3,000 rpm) 离心 5 分钟，轻轻倒出上清，加入 200 μl PBS 反复吹打至细胞全部重新悬浮。

注：如果使用冷冻的细胞团，加入PBS前在冰盒中完全解冻细胞。

2、细胞裂解

在上述悬浮液中加入 20 μl 蛋白酶 K 和 2 μl 溶菌剂立即混匀。然后加入 200 μl 缓冲液 CB，脉冲漩涡振荡充分混匀，65℃ 温育 10 分钟。

3、进行步骤 4（加入乙醇）

C. 动物组织中DNA的提取

1、组织准备

取 10-20mg 组织，用一干净刀片切成小块。

注：可以用研钵和研棒将组织（不超过 30mg）在液氮中磨成细粉，以便有效裂解。

2、组织裂解

在样本中加入 250 μl 缓冲液 TL 和 20 μl 蛋白酶 K，脉冲漩涡振荡充分混匀，获得一份均匀溶液。加入 12 μl 溶菌剂立即混匀，放入水浴恒温摇床，65℃ 温育 1-3 小时（如果组织混合物出来不清晰，需要温育过夜），也可在温育过程中偶尔混匀样本，确保样本完全消化。

注：如果组织没有绞碎，用管杵捣碎样品，使样品在缓冲液 TL 中同质化。不同类型的组织在溶解程度上也不尽相同。如果仍有不溶解的组织存在，延长水浴时间，或者增加蛋白酶 K 的数量，确保组织细胞完全裂解。

RNA 的去除（可选）

如果要求 DNA 中无 RNA 存在，则加入 20 μl RNA 酶 A（无 DNA 酶，20mg/ml），混合并 37℃ 温育 10 分钟。

3、均质化

加入 2 倍体积的缓冲液 CB（若无 RNA 酶 A 处理，则加入 560 μl；若经 RNA 酶处理，则加入 600 μl），脉冲漩涡振荡充分混匀，直到获得一份均匀的溶液。65℃ 温育 10 分钟。

4、加入乙醇

加入 200 μl 无水乙醇，立即脉冲漩涡振荡，充分混匀，获得一份均匀溶液。

注：立即混匀以防止任何由于局部高浓度乙醇引起的不均匀核酸沉淀。

5、装载到亲和柱

将大约 600 μl 样品转移到一个带有干净收集管的亲和柱中，5000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复操作步骤 4 中剩余样本。

6、亲和柱洗涤 1

加入 500 μl 洗涤液 1 于亲和柱中，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液 1 已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

7、亲和柱洗涤 2

加入 500 μl 洗涤液 2 于亲和柱中，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复洗涤一次。

注：使用前确保洗涤液 2 已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

8、亲和柱干燥

10,000 x g (11,000 rpm) 离心柱子 1 分钟，除去所有残留乙醇。

9、DNA 洗脱

将亲和柱放入一干净的微量离心管中，取 100-200 μl 预热洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加到亲和柱的膜中央，室温静置 2 分钟，5,000 x g (8,000 rpm) 离心 1 分钟，以洗脱 DNA。DNA 4℃ 或 -20℃ 保存。

故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	样品没有完全均质化	确保组织在缓冲液 TL 中完全均质化。
		血液样品小包装保存，避免反复冻融。
	样品不新鲜或没有正确保存	对于需要长期保存的组织，应 -70℃ 保存。
	样品裂解不完全	在恒温水浴摇床温育过程中不断地混匀样本，确保组织在缓冲液 TL、蛋白酶 K 和溶菌剂中完全均质化。
		确保动物培养细胞在 PBS 中完全均质化，65℃ 温育前，蛋白酶 K，溶菌剂和缓冲液 CB 混合液需经脉冲漩涡振荡均匀。
		确保加入蛋白酶 K 前，缓冲液 CB 和血液样本已脉冲漩涡振荡混匀。
	洗涤液 1 和洗涤液 2 使用顺序错误	确保洗涤液 1 在洗涤液 2 之前使用。 使用新样本重新提取。
	洗涤液 1 和洗涤液 2 浓缩液未稀释	请参照“配制方案”。 使用新样本重新提取。
	蛋白酶 K 活性降低	确保蛋白酶 K -20℃ 保存。
	洗脱效果差	洗脱液 65℃-70℃ 预热
加入洗脱液后的柱子在室温下温育 2 分钟。 确保所用洗脱液为低盐缓冲液或 pH 值 7.0-8.5 水。		
柱子堵塞	参照下面问题“柱子堵塞”	

问题	可能的原因	建议
纯度低(A_{260}/A_{280})	蛋白质变性不完全	使用新鲜的蛋白酶K并延长温育时间直到裂解产物清澈。
	未使用洗涤液 1 洗涤	确保在加入洗涤液 2 之前亲和柱已用洗涤液 1 洗涤。
	蛋白酶K活性降低	参照问题“DNA得率低”。
柱子堵塞	柱子装量超载	不要使用超过推荐数量的样品材料, 如果有任何未消化的物质遗留, 离心去除组织裂解产物, 转移上清到一个新的微量离心管。
DNA 降解或污染	纯化过程中, DNA碎裂	在加入缓冲液TL和蛋白酶K后, 避免剧烈混合和吹打。如果出现粘稠状裂解产物, 使用稍微剪开的吸管尖。
	陈旧的样本	陈旧样本中的DNA已经分解。
	样本反复冻融	避免反复冻融样本。
洗脱的 RNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的 DNA 含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。
	用 TE 缓冲液洗脱 DNA, TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制酶反应	用洗脱液或 pH 为 7.0-8.5 的水洗脱 DNA

上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址: 上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话: 021-68060114

传真: 021-68060114

邮箱: info@kestrel-china.com

网址: www.kestrel-china.com

Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivantechnologies.com

international@vivantechnologies.com

Web: www.vivantechnologies.com