

组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒

Tissue/Cell Genomic DNA Kit

(离心柱型)

目录号: SD08

产品内容

试剂盒组成	保存	SD08-1 10次	SD08-2 50次	SD08-3 100次
Buffer A (细胞裂解液)	室温	2.5 ml	11 ml	20 ml
Buffer B (结合液)	室温	2.5 ml	11 ml	20 ml
Buffer C (杂质去除液)	室温	5 ml	25 ml	50 ml
Buffer WB	室温	3 ml	15 ml	25 ml
Buffer TE	室温	3 ml	15 ml	15 ml
DNA Columns & Collection Tubes	室温	10 套	50 套	100 套
蛋白酶 K 粉 (20mg/ml)	-20°C	4 mg	20 mg	2×20 mg

其他相关产品

目录号	名称	规格	保存	是否必备	说明
ST53-2	RNase A	25mg	-20 °C	选配	本试剂盒 50 次需备 1 支

溶解方法: 短暂离心后, 加入 1 毫升灭菌水或 TE Buffer(pH 8.0)溶解, 溶解后请根据自己的使用情况分装成小管冻存并于 -20°C 保存, 以免反复冻融失活。

储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25 °C) 干燥条件下可保 12 个月; 更长时间的保存可置于 2-8 °C。在 2-8 °C 保存条件下。若产生沉淀, 使用前应先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 min, 以溶解沉淀。避免试剂长时间暴露

于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品简介

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，然后基因组 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，杂质去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点

1. 不需使用有毒的苯酚，无需乙醇沉淀
2. 快速提取各种动植物细胞/组织基因组 DNA
3. 操作便捷，产量高
4. OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 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。

注意事项（请在使用本试剂盒前务必仔细阅读此项）

1. 自备试剂：1×PBS(磷酸盐缓冲液),和异丙醇
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70 °C 备用
3. 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pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。

操作步骤

使用前请先在 Buffer WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀并做上标记

1. 组织培养细胞
 - a. 收集约 10⁵-10⁶ 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 10-20μl 残留的液体。
 - c. 加 200μl 1×PBS 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 180μl 1×PBS 中。
 - d. 加入 20μl 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入 200 μl BufferB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70°C 放置 10 分钟。
可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200μl BufferB 前加 20μl RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。
 - e. 冷却后加 210μl 无水乙醇或异丙醇，**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）加入一个吸附柱 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. 接操作步骤项下 4。

2. 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（切成小块可以提高产量）后取 20-50mg，转入装有 180 μ l BufferA 的 1.5ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ 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。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多,需要去除 RNA,可在完成步骤 c 后加 20 μ l RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

d. 加入 200 μ l Buffer B，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。

e. 冷却后加 210 μ l 无水乙醇或异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 用 1 ml 的枪头吸取混合物，将混合物加入一个吸附柱 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。

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. 接操作步骤项下 4。

3. 动物组织（鼠尾）

a. 将 0.2-0.5 cm 的鼠尾巴尖(即 20-50 mg)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 μ l BufferA 的 1.5ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ l 的蛋白酶 K(20 mg/ml)，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

c. 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ 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。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多,需要去除 RNA,可在完成步骤 c 后加 20 μ 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，如果固体物质较多，可 12,000rpm 离心 60 秒，取上清。

- e. 加入 200 μl Buffer B 和 210 μl 无水乙醇或异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀。
- f. 将上清加入一个吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
- g. 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，混匀不充分严重降低产量，必要时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 Buffer C，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。
5. 加入 500 μl BufferWB（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 500 μl BufferWB，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，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100 μl Buffer TE（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热效果更好），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 ，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。
9. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ ，如果要长时间存放，可以放置在一 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

问题与解决方法

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-建议：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 20 μl 蛋白酶 K 消化 1-2 小时。</p> <p>*蛋白酶 K 失效了-建议：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-建议：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-建议：样品处理前妥善保存在 -20$^{\circ}\text{C}$，处理量不要过量。</p>