TEL:010-89941170
QQ:983086419
Web：www.wonstart.com
BeiJing WonStart Biotech Co.,Ltd

组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒

Tissue/Cell Genomic DNA Kit

（溶液型）

目录号：SD09

产品内容

试剂盒组成	保存	SD09-1 10 次	SD09-2 50 次	SD09-3 100 次
Buffer A （裂解液）	室温	6 ml	30 ml	60 ml
Buffer B （蛋白去除液）	室温	2 ml	10 ml	20 ml
Buffer TE	室温	2 ml	10 ml	15ml
RNase A 干粉 (10mg/ml)	室温	20 ul	100 μl	200 μl

其他相关产品

目录号	名称	规格	保存	是否必备	说明
ST54	蛋白酶 K （处理动物组织）	20 mg	-20 ℃	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℃保存，以免反复冻融失活。

储存条件

该试剂盒置于室温（15-25 ℃）干燥条件下可保存 12 个月；更长时间的保存可置于 2-8 ℃。在 2-8 ℃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 ℃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

本试剂盒用于快速的从动植物细胞/组织中提取基因组 DNA。样品研磨或者匀浆后加入裂解液，首先在强去污剂或者和蛋白酶 K 协同作用下裂解细胞释放出基因组 DNA，接着加入 RNase A 去除 RNA，然后蛋白去除液选择性沉淀去除蛋白，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

产品特点

1.不需使用有毒的苯酚，氯仿
2.操作便捷，产量高，比离心柱型的产量高一倍以上
3. OD260/OD280 典型的比值达 1.7～1.9，长度可达 50 kb -150kb，可直接用于构建文库，PCR，Southern-blot 和各种酶切反应
4. 本试剂盒可以按照比例扩大或者缩小每次处理的组织细胞量，请联系我们索取其它处理量的操作手册。

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：用户需自备异丙醇、70%乙醇、PBS(用于细胞)、液氮研钵/或匀浆器(用于组织）、0.5M EDTA和蛋白酶K(用于鼠尾)、水浴箱。

2. 开始实验前将需要的水浴先预热备用

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

1. 组织培养细胞

a. 收集细胞到一个 1.5 ml 离心管；对于贴壁细胞，先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b. 13,000 rpm 离心 10 秒，使细胞沉淀下来，弃上清，留下细胞团和大约 10-50 µl 残留的液体。

c. 加 200 µl PBS 重悬洗涤细胞，重复上一步骤，高速涡旋振荡重悬细胞团。

d. 对于裂解液裂解效果不好的细胞系（例如 PC12 细胞），在做下一步骤前，应该做几次冻融循环：冻于液氮后，在 95℃水浴融化，重复 4 次。

e. 加入 600 µl Buffer A，用大口径的枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打裂解细胞直至看不见细胞团块。

f. 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. 600 µl 冰预冷的 Buffer A 加入 10-20 mg 新鲜或者解冻的组织，用小匀浆器匀浆 10 秒钟，将裂解物转入 1.5 ml 离心管。另一种方法：在液氮中研磨 10-20 mg 组织（植物叶片可以适当多加如用 40mg）成细粉后，转入装有 600 µl 冰预冷的 Buffer A 的 1.5 ml 离心管， 用大口径枪头吹打混匀。

b. 将裂解物放置在 65℃水浴 15-30 分钟。

c. 接**操作步骤**项下 4。

3. 动物组织（鼠尾）

a. 处理样品前，先加入 120 µl 0.5M EDTA（pH 8.0）到装有 500 µl Buffer A 的 1.5 ml 离心管中，混匀后冰预冷备用。

b. 将鼠尾在液氮中研磨成细粉或者将 0.5-1.0 cm 的鼠尾巴尖（一定要剪 0-2 cm 范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好）剪碎放入一个 1.5 ml 离心管后，加入 600 µl 上步配好的 EDTA/细胞核裂解液。

c. 加入 17.5 µl 蛋白酶 K 溶液(20 mg/ml)，颠倒混匀。

d. 55 ℃水浴放置过夜，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。或者在一个摇床上 55℃水浴 3 小时，每一个小时高速涡旋振荡混匀一次。确保鼠尾裂解完全（没剪碎的鼠尾，可能不能完全裂解，产量会低一些）。

4. 加入 1.8µl RNase A（10 mg/ml）至裂解物中，即 RNase A 终浓度 30 µg/ml，颠倒混匀后 37℃温育 15-30 分钟去除残留 RNA。然后**室温冷却至少 5 分钟或者冰浴使回复到室温**。

5. 在回复到室温的裂解物内加入 200 µl Buffer B 后，在**涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒**。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。**冰浴 5 分钟**。

注意：由于样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA。如果用手振荡混匀，则不可以用手上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA；但是力度也不能太小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开， 离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分， 最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器

6. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时应该可以见到管底蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

7. 小心缓慢吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管中，不要吸到沉淀。

注意：吸取上清时，注意不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 2 分钟后取上清。

8. 加入等体积室温异丙醇（约 600 µl），颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

注意：颠倒混匀的时候，棉絮状（丝状）DNA 有时会粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 9，直接 12,000 rpm 离心 1 分钟，弃上清，然后接步骤 11。

9. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。

注意：如果棉絮状（丝状）DNA 沉淀附着有气泡，则会漂浮在液体表面，而不会沉淀下来，要小心避开沉淀吸取上清，不要把沉淀给吸掉了。

10. 加入 1ml 70%乙醇后，颠倒漂洗 DNA 沉淀，12,000rpm 离心 1 分钟，在管底可以见到白色的 DNA

沉淀块，倒弃上清。

11. 加入 1ml 70％乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，12,000rpm 离心 1 分钟， 倒去上清（注意不要把 DNA 沉淀倒掉了），倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇，还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

注意：不要干燥过头，否则 DNA 极其难溶；也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

12. 加入 100μl Buffer TE 重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65℃温育 30-60 分钟（不要超过一小时），期间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4℃放置过夜来重新水化 DNA。

13. DNA 可以存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在－20℃。

问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	*使用了不恰当的裂解液，造成裂解不完全-**建议**：处理材料不要过量。 *有的组织如肌肉，鼠尾处理困难-**建议**：尽量将材料研磨细匀浆完全。 * DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了-**建议**：异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中，倒弃上清的时候要格外小心，不要把 DNA 沉淀也倒掉了。
A260/A280>1.9	* RNA 酶处理时间不够造成 RNA 污染-**建议**：可以加大 RNA 酶用量或者处理时间延长到 1 小时。 * DNA 剪切断了-**建议**：严格按照操作步骤，动作不可以太剧烈。
A260/A280 <1.6	*蛋白质残留高-**建议**：保证重复的裂解液用量和时间；看看后面“未见到蛋白沉淀”问题的评论与建议，确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 7，防止蛋白污染。 *测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-**建议**：使用 TE 缓冲液来稀释 DNA，保证 pH 值大于 8.0。 * DNA 没有完全溶解-**建议**：可在 65°C温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4°C放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。
变色的 DNA	*如果异丙醇沉淀后没有迅速进行 70％乙醇漂洗的步骤，有的组织如肝脏提取出的 DNA 可能会变色-**建议**：异丙醇沉淀离心后，马上进行 70％乙醇清洗的步骤。
DNA 沉淀难以重新溶解水化	*晾干 DNA 沉淀时过度了-**建议**：晾干时候密切观察，不要干燥过头，注意应该观察管底的 DNA 沉淀，有时候管壁上的残留乙醇已经挥发，但留下一些水分还没有干，只要管底 DNA 干了就可以加入 DNA 溶解液。可在 65°C温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4°C放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。