

## 旋达®R1 核酸抽取系列

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒

### 一、简介

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DePure Tissue DNA Kit)适用于动物组织、培养细胞、抗凝血液、体液、分泌物等生物样品的 DNA 提取。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30 分钟（不含消化时间）。动物组织基因组 DNA 提取试剂盒一次可处理 1~20mg 组织样品、1~200μl 抗凝血液或体液样品、 $5 \times 10^6$  个培养细胞，得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、LAMP、Real-Time PCR 等下游实验。

### 二、原理

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液(Buffer MTL)和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入 Buffer AL 和乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随溶液滤出。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer AE)洗脱，洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、LAMP、Real-Time PCR 等下游实验。

DePure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(Buffer AE)洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

### 三、组成

#### DePure Tissue DNA Kit

071041M	
成份	含量
提取次数	48 次
DePure gDNA Mini Columns	48 个
2ml Collection Tubes	48 个
Buffer MTL	40 ml
Buffer AL	20 ml
Buffer GW1	14 ml
Buffer GW2	20 ml
Proteinase K	24 mg
Protease Dissolve Buffer	2ml
RNase Solution	300 μl
Buffer AE	25ml
说明书	1 份

### 四、保质期

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒除 Proteinase K 外，可在室温下(15-25°C)干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8°C。低温下，Buffer MTL 可能会有沉淀形成，需 37°C 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 干粉和 RNase Solution 室温运输，收到试剂盒后请保存于 2~8°C 或 -20°C。

### 五、需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96%-100%)
- 灭菌的离心管和吸头
- 小型离心机(13,000rpm)
- 水浴锅或金属浴
- 按瓶子标签所示, 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml, 颠倒混匀让蛋白酶 K 充分溶解, 于-20°C保存。

071041M, 48 次	加入 1.2ml Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 管子中, 颠倒混匀使蛋白酶 K 充分溶解, 保存于-20°C。
---------------	--

- Buffer GW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

071041M, 48 次	加入 28 ml 无水乙醇
---------------	---------------

- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

071041M, 48 次	加入 80ml 无水乙醇
---------------	--------------

## 六、方案 1. 动物组织 DNA 提取

该方案适合于从 1~20mg 动物组织, 如肝脏、脾脏、肾脏、老鼠尾巴等组织样品中提取 DNA, 以下离心操作都在室温进行。

1. 把 1~20 mg 组织样品(或 10 mg 肝脏、肺或脾脏)剪切成尽量小的碎片, 并转移至 1.5ml 离心管中。加入 230 $\mu$ l Buffer MTL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 涡旋混匀。55°C水浴 1~3 小时或过夜消化样品。水浴期间需偶尔涡旋混匀, 或放置于振荡水浴锅中。

注: 适当的组织用量才能获得理想的提取结果, 样品过多会降低产量和纯度。脾脏、肝脏、肾脏等组织样品富含 DNA, 不宜超过 10mg。肌肉和皮肤等样品用量可用到 30mg 以提高产量。将组织块尽量剪切成小碎片可缩短消化时间。采用液氮研磨, 匀浆器处理组织样品可达到缩短消化时间的目的。小鼠尾巴最大用量为 1.2cm, 大鼠尾巴最大用量为 0.6cm。消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。一般组织样品需 1-3 小时, 老鼠尾巴需 6-8 小时。过夜消化没有负面影响。

2. 加入 5 $\mu$ l RNase Solution 至消化液中混匀。室温或 37°C水浴锅中放置 15~60 分钟降解 RNA。

注: RNase Solution 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 RNA, 需较长的消化时间。

3. (可选)10,000rpm 离心 3 分钟。转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。

注: 若消化液比较浑浊或存在明显的颗粒, 不要省略此步。

4. 加入 250 $\mu$ l Buffer AL 至消化液中。最高速度涡旋混匀 30 秒。70°C水浴 10 分钟。

5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中。最高速度涡旋混匀 30 秒。

注: 处理肝脏或脾脏等组织时, 加入乙醇时会有沉淀形成, 属正常现象。用移液枪吸打 10-15 次尽量打散沉淀团。

6. 把 DePure gDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移第五步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000rpm 离心 1 分钟。

注: 若柱子出现堵塞, 延长离心时间。

7. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000rpm 离心 1 分钟。

注: Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

8. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500  $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000rpm 离心 1 分钟。

注: Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

9. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。再加入 500  $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子

中。10,000rpm 离心 1 分钟。

10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 rpm 离心 1 分钟。
12. (可选)再加入 30~100μl 预热至 70°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。

注：处理 DNA 含量很低的样品无需第二次洗脱。

13. 丢弃 DNA 结合柱，DNA 保存于 2-8°C，长期保存需保存于-20°C。

## 七、方案 2. 体液/细胞 DNA 提取

该方案适合于从动物血液，血清，血浆，唾液等液体样品中直接提取 DNA，以下离心操作都在室温进行。

### 1. 样品的处理

- a) 红细胞带核的血液样品：鸟类/鱼类等非哺乳类动物血液的红细胞带细胞核，其 DNA 含量极为丰富。在 1.5ml 离心管中，加入 1-10μl 抗凝血液样品。用 Buffer PBS 或灭菌水调整总体积为 200 μl，涡旋混匀，按第 2 步进行。
- b) 红细胞不带核的血液样品：在 1.5ml 离心管中，1-200μl 抗凝血液样品。用 Buffer PBS 或灭菌水调整总体积为 200 μl，按第 2 步进行。
- c) 唾液或其它液体样品：在 1.5ml 离心管中，加入 1-200μl 唾液或其它液体样品，用 Buffer PBS 或灭菌水调整总体积为 200 μl，按第 2 步进行。
- d) 培养细胞( $5 \times 10^6$ )：500 rpm 离心收集细胞，倒弃培养液。加入 200μl Buffer PBS 或灭菌水涡旋重悬细胞。

2. 加入 20μl Proteinase K 至样品中，轻轻拍打几次混匀。

3. 加入 200μl Buffer AL 至样品中，最高速度涡旋混匀 30 秒。65°C 水浴 30 分钟。

注：若需去除 RNA，加入 5ul RNase A 至消化液中，室温静置 15~30 分钟。

4. 加入 200μl 无水乙醇至消化液中。最高速度涡旋混匀 30 秒。

注：若加入乙醇后有沉淀形成，用移液枪吸打 5 次打散沉淀团。

5. 按方案 1 的第 6~13 步进行操作。

## 八、常见问题解答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因	解决方法
柱子堵塞	样品消化不充分	用液氮或匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
	样品用量太多	减少样品用量。富含核酸的样品如肝脏，脾脏，肺脏等样品，组织用量不要超过 10mg。
	需要离心去除不消化物质	若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 10,000rpm 离心 5 分钟去除未消化的物质。
	用移液枪打散沉淀	加入乙醇后，消化液可能会有沉淀析出，用移液枪吸打尽量打散沉淀团。
	Proteinase K 活	重新制备 Proteinase K。分装保存 Proteinase

	性下降	K, 避免反复冻融, Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。
<b>DNA 产量低</b>	样品 DNA 含量低	组织样品本身含量低, 用富含核酸的肝脏, 脾脏来提取
	柱子堵塞	参照上述情况
	洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大, 水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
	Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
	柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
<b>RNA 污染</b>	延长 RNase 消化时间	动物的内脏如肝脏和肾脏, 以及培养细胞富含 RNA, 延长 RNase 消化时间至 60 分钟。
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	RNA 污染	加入 RNase 酶消化, 或延长 RNase 酶的消化时间
	Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20°C。分装保存 Proteinase K, 避免反复冻融。
	加入 Buffer AL 后混匀不充分	重新提取, 加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3-5 次, 然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
	Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示, 加入正确的乙醇。

若以上的解答还是无法解决您的问题, 请您联系我们。

## 九、企业信息

广州双螺旋基因技术有限公司

网址: [www.dhelix.cn](http://www.dhelix.cn)

电话: 020-85671013

传真: 020-34037175

地址: 广州国际生物岛螺旋四路 7 号标准产业单元二期第三栋第三层 302 单元