

动物组织 gDNA 提取试剂盒

(离心柱型)

产品编号	规格
K317-S	10 次
K317-M	50 次
K317-L	100 次

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心柱和独特的缓冲液系统，提取多种动物（软体动物、水产动物、哺乳动物、节肢类动物、昆虫等）组织\细胞中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基材料为本公司特有新型材料，能够高效、专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白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。

一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	保存	K317-S	K317-M	K317-L
纯化次数		10 次	50 次	100 次
蛋白酶 K	-20℃	20mg/支×1 支	20mg/支×1 支	20mg/支×2 支
样品处理液 (ETB)	室温	2mL/瓶×1 瓶	10mL/瓶×1 瓶	20mL/瓶×1 瓶
裂解液(Buffer ATL)	室温	5mL/瓶×1 瓶	30 mL/瓶×1 瓶	60mL/瓶×1 瓶
洗液 1 (wash1)	室温	6mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×1 瓶	36 mL /瓶×1 瓶
洗液 2 (wash2)	室温	2mL /瓶×1 瓶	10mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×1 瓶
Elution Buffer	室温	1mL /支×1 支	10 mL /瓶×1 瓶	10 mL /瓶×1 瓶
离心柱	室温	10 个	50 个	100 个
说明书	室温	1 份	1 份	1 份

*需要但未提供的试剂：无水乙醇、RNase (10mg/ml)

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时，若裂解液(Buffer ATL)产生沉淀，请先将裂解液 (Buffer ATL) 室温 (20-30℃) 条件下放置一段时间，必要时可放 37℃ 水浴中温浴 10 min，以溶解沉淀。蛋白酶 K 收到后请立即使用或放于-20℃下保存，室温放置半个月有效。

二、实验前准备

- 56℃ 水浴锅或恒温金属浴、涡旋振荡器、掌心离心机
- 蛋白酶 K 溶液需保存-20℃，从冰箱中取出解冻，反复冻融降低蛋白酶 K 活性。
- 使用前，请按下表准确加入 98-100%的乙醇。

	10T	50T	100T
洗液 1 (wash1)	6ml	18ml	36ml
乙醇	4ml	12ml	24ml

	10T	50T	100T
洗液 2 (wash2)	2ml	10ml	18ml
乙醇	8ml	40ml	42ml

三、操作步骤 A（离心法）

使用前请先在洗液1 (wash1) 和洗液2 (wash2) 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取组织样品10~20mg，用剪刀剪切成尽量小的碎片，并转移至1.5mL的离心管中。加入200 μ l 样品处理液 (Buffer ETB) 和20 μ l 蛋白酶 K至样品中。涡旋混匀，56 $^{\circ}$ C水浴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。

(过多的样品会降低产量和纯度。脾脏、肝脏、肾脏等组织不超过 10mg。小鼠尾巴最大用量为 1.2cm，大鼠尾巴最大量为 0.6cm。若消化后还有组织块残留，10000rpm 离心 1min。转移上清 200 μ L 至新的离心管中，按第 2 步操作。注意：不同组织裂解时间不同，通常需 1-3 h 即可完成（鼠尾需要消化过夜）。不会影响 后续操作。每小时颠倒混合样品 2-3 次，用水浴振荡器也可。)

2. (可选) 加入10 μ l RNase (10mg/ml ; 未提供，需要另购) 至消化液中，颠倒混匀，室温或 37 $^{\circ}$ C放置 15~60 分钟。

RNA 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)12,000 \times g 离心3 分钟，转移上清液至新的1.5ml 离心管中。

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350 μ l裂解液ATL，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C放置10 min，溶液应变清亮，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

5. 加入350 μ l无水乙醇，充分振荡混匀15 sec，此时可能会出现絮状沉淀(絮状物为析出的DNA)，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

6. 吸取650 μ l混合液到离心柱上，12000 rpm离心1 min，弃掉收集管中的废液，将离心柱放回收集管中。

7. 将剩下的混合液全部转移到离心柱上，12000 rpm离心1 min，弃掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

8. 向离心柱中加入600 μ l洗液1(Wash 1)(请检查是否已经加入无水乙醇)，12000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

9. 向离心柱中加入600 μ l 洗液2(Wash 2)(请检查是否已经加入无水乙醇)，12000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

10. 12000 rpm 空离心3 min，使吸附膜完全变干。

11. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100 μ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。

12. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20 $^{\circ}$ C保存或立即使用。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入离心柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min。

五、操作步骤 B（负压法）

步骤 1-4 同离心法。

5. 将离心柱连到负压装置（如真空抽滤盒）上，将第4步获得的溶液转移到离心柱中，开启并调节负压至800mba，缓慢吸走液体。
6. 向离心柱依次加入600 μ l洗液1(Wash 1)、600 μ l洗液2(Wash 2)，使用负压装置使得液体通过离心柱。
7. 干抽2min，使得离心柱上的乙醇挥发完全，然后关掉负压装置；
8. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100 μ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。
9. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20 $^{\circ}$ C保存或立即使用。

Surbiopure

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 降解	
电泳条带涂抹	处理过程中，使用无 RNase&DNase 的耗材，样品保证新鲜，避免反复冻融造成样品的降解。
DNA 产量低	
组织裂解不彻底	增加蛋白酶 K 的用量或组织样品减少或尽量将样品粉碎成小块
水产动物组织 DNA	水产动物组织（多糖、多酚），请使用我们的磁珠 DNA 纯化试剂盒，对基因组 DNA 进行纯化回收，此类样品不可避免。
电泳堵孔	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。
RNA 污染	
延长 RNase 消化时间	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
OD260/280 或 OD260/230 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
核酸浓度太低	核酸浓度很低时，OD 比值偏差较大