

细胞/血液基因组DNA中量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.1.1.0)

产品说明

- ◇ 可从3ml以内全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁等样品里提取到高纯度的基因组DNA。
- ◇ 获得的基因组DNA产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等敏感分子生物学实验。

产品货号：

TD327-25 (25次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	1
样品来源	2
溶液制备	2
操作步骤	2
组件查询	5

产品组份

试剂盒组成	25次	保存
蛋白酶K	3×20mg	-20℃
蛋白酶K保存液	3×1.2ml	-20℃
液体与细胞消化液（红）	2×45 ml	室温
基因组DNA裂解液	150ml	室温
基因组DNA洗涤液1	250 ml	室温
基因组DNA洗涤液2	200ml	室温
基因组DNA洗脱液	10 ml	室温
5号E纯化柱+15漏斗	25个	室温
2ml收集管	50个	室温

注意事项

- ◇ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ◇ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。
- ◇ 环境温度低时，液体与细胞消化液（红）、基因组DNA裂解液或者基因组DNA洗涤液1可能出现析出和沉淀，可以在37℃水浴几分钟帮助重新溶解使用。

产品特性

- ◇ 样品种类:全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁等样品，保存在保护剂里的样品等。获得的基因组DNA产量高、纯度好，可以直接用于PCR等各种分子生物学实验。不推荐使用此试剂盒提取小DNA或者游离DNA(可使用TD476产品)
- ◇ 基因组DNA大小:一般可回收到大于50kb的基因组DNA。如果样品中存在线粒体DNA，病毒DNA等也会一起提取到。
- ◇ DNA纯度:获得的基因组DNA产量高、纯度好，可以直接用PCR等各种分子生物学实验。一般情况Abs260/280 ≥ 1.8， Abs260/230 ≥ 2.0。
- ◇ 基因组DNA产量:针对哺乳动物一般100μl全血中回收到3μg以上的基因组DNA
- ◇ 需要的仪器设备:水浴锅或者金属浴（55℃）。微型离心机，涡旋仪。

样品来源

液体样品

可从 $\leq 3\text{ml}$ 以内的全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁等样品里提取到总DNA.见附录。

- ✧ 对于保存在DNA/RNA保护剂里的液体样品见附录。
- ✧ 有核血液样品，比如禽类血液的操作步骤，见附录。
- ✧ 对于从血清或血浆中提取病毒DNA,按照生物液体和细胞的操作流程即可。对于游离DNA的提取，推荐使用 游离DNA提取试剂盒（TD476）
- ✧ 对于提取尿液中细胞的DNA,在 $3,000\times g$ 离心力下离心15分钟富集细胞，在提取之前去除上清，然后按照 生物液体及细胞操作步骤操作。

哺乳动物或昆虫细胞培养物

可从 $\leq 3\times 10^7$ 细胞内像HeLa细胞,HEK-293细胞,Drosophila等样品里提取到总DNA。

- ✧ 在处理细胞沉淀之前需要去除培养基。（大约在 $500\times g$ 离心力下离心2分钟，取决于细胞类型和体积，然后 去除上清）
- ✧ 对于哺乳动物细胞，蛋白酶K的消化时间在 55°C 下可以减少到30分钟。
- ✧ 对于单层细胞和口腔细胞的制备和收集，请参阅附录。
- ✧ 对于保存在DNA/RNA保护剂中的样品。参看附录。

溶液制备

- ✧ 在操作之前，需添加 $1060\mu\text{l}$ 蛋白酶K保存液到每管蛋白酶K（20mg）中。蛋白酶K溶液的浓度为 20mg/ml ,混匀后，需要放到 -20°C 长期保存。

操作步骤:

使用基因组DNA洗脱液或其他等渗溶液（如PBS）来重悬培养的细胞沉淀。

（ $< 1\times 10^6$ 细胞使用 $500\mu\text{l}$ 基因组DNA洗脱液 $1-3\times 10^7$ 细胞数使用 $1,000\mu\text{l}$ 基因组DNA洗脱液）
 55°C 下的蛋白酶K过夜消化不会影响DNA的完整性。

生物液体和细胞
<ol style="list-style-type: none">1. 添加最多3ml的样品到一个50ml离心管（不提供）中并且添加： 3ml液体与细胞消化液（红） 100μl蛋白酶K 注意：如果样品不足3ml则需要按照比例调整液体与细胞消化液（红），蛋白酶K及其基因组DNA裂解液的用量(参考表1)。2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后再55°C下孵育 40分钟（样品量$\leq 1\text{ml}$）2小时（样品量$\leq 3\text{ml}$）。3. 混匀1倍体积的基因组DNA裂解液到消化的样品中（无需考虑蛋白酶K的体积），混匀或者

涡旋振荡10-15秒。

例如：添加6ml的基因组DNA裂解液到6ml消化的样品中。

表1

样品体积	500µl	1ml	2ml	3ml
液体与细胞消化液 (红)	500µl	1ml	2ml	3ml
蛋白酶K	20µl	30µl	70µl	100µl
混匀并且在55°C下孵育30分钟, 40分钟 (样品量≤1ml) 2小时 (样品量≤3ml)				
基因组DNA裂解液	1ml	2ml	4ml	6ml

DNA纯化步骤 (兼容负压和离心两种方式)

离心操作步骤	负压操作步骤
<ol style="list-style-type: none"> 1. 确认5E柱套装 (连接15ml套筒) 连接紧密后放置 在一个50ml离心管里, 倒入上一步的混合液, 拧紧 盖子。 2. 在1, 000xg离心力下离心5分钟。倒掉滤出液。 3. 添加9ml的基因组DNA洗涤液1到5E柱中, 在1, 000xg离心力下离心5分钟。倒掉滤出液。 4. 添加7ml的基因组DNA洗涤液1到5E柱中, 在1, 000xg离心力下离心5分钟。倒掉滤出液。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 确认5E柱套装 (连接15ml套筒) 连接紧密后放置 在真空多联器上, 倒入上一步的混合液到与5E柱连接的 15ml套筒中。 2. 打开真空源, 压力设置在≥500mmHg. 让混合物完全 通过5E柱。 3. 关闭真空源, 添加9ml基因组DNA洗涤液1到5E柱套装 中, 打开真空源让液体完全通过柱子。 4. 关闭真空源, 添加7ml基因组DNA洗涤液2到5E柱套装 中, 打开真空源让液体完全通过柱子。

5. 去掉15ml套筒, 将5E柱套在一个收集管内。在12, 000xg离心力下空转1分钟去除残留液体。
6. 将5E柱套在一个新的收集管内, 添加200µl基因组DNA洗涤液2, 在12, 000xg离心力下离心1分钟, 倒掉滤出液。
7. 将5E柱套在一个干净的1.5ml离心管内, 添加200µl基因组DNA洗脱液到柱基质上。(洗脱液事先在65-70°C 水浴中预热, 洗脱效果更好), 室温放置5分钟, 在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱DNA。

附录A:

单细胞层样品提取

以下步骤是针对从 5×10^7 以内的细胞单层而设计的。虽然细胞类型和培养环境不同, 但此操作步骤兼容高密度和 低密度的生长细胞。

用胰蛋白酶消化或者从培养板等容器中刮下贴壁细胞。在500xg下离心5分钟细胞悬液, 去除上清液, 用1ml的PBS重悬细胞沉淀并将细胞悬液移至一个离心管中。再次在500xg下离心5分钟细胞悬液。去除上清液, 之后按照生物液体及细胞的操作步骤进行操作。

以下表格为细胞量仅供参考, 实际情况会因细胞类型的不同而有所差异

培养容器	孔或瓶的表面积	细胞数
96孔培养板	0.32-0.6 cm ²	4-5 × 10 ⁴ cm ²

24孔培养板	2 cm ²	1-3×10 ⁵ cm ²
12孔培养板	4 cm ²	4-5×10 ⁵ cm ²
6孔培养板	9.5 cm ²	0.5-1×10 ⁶ cm ²
T25培养瓶	25 cm ²	2-3×10 ⁶ cm ²
T75培养瓶	75 cm ²	0.6-1×10 ⁷ cm ²
T175培养瓶	175 cm ²	2-3×10 ⁷ cm ²

口腔脱落细胞及其拭子

提取口腔细胞可以通过漱口或者口腔拭子等方式

A. 漱口提取方法：用10-20ml盐溶液或者漱口水剧烈的漱口30秒。漱的越剧烈，获得的细胞会越多。将盐溶液吐到一个50ml的离心管中，在1,500RPM的转速下离心5分钟。去除上清，但不要影响细胞沉淀。之后按照生物液体及细胞的操作步骤进行操作。

B. 口腔拭子提取方法：在收集细胞之前用清水漱口。用口腔拭子刷脸颊内侧15秒（约20下），确保覆盖了脸颊内侧的所有区域。将拭子放在一个干净的离心管内，用200μl液体与细胞消化液（红）与200μl基因组DNA洗脱液的混合液清洗拭子。添加20μl的蛋白酶K混匀，然后在55°C下孵育10分钟。然后从生物液体及细胞操作步骤的第3步进行操作。

附录B:

保存在DNA/RNA保护剂中的样品

DNA/RNA保护剂可以在常温下稳定DNA和RNA，方便样品的运输，无需冰箱或者冷链运输，并且能有效裂解细胞，灭活样品中的病毒。相关产品信息可与我公司联系。（TR110或TR120）

生物液体及细胞培养物的操作步骤如下：

1. 添加20μl的蛋白酶K到400μl含有样品的保护剂中。
2. 混匀或者涡旋10-15秒在室温下孵育20分钟。
3. 然后从生物液体及细胞操作步骤的第3步进行操作。

附录C:

有核血液样品

1. 添加150μl的有核血液样品到以下混合液中：

液体与细胞消化液（红）	3 ml
蛋白酶K	100μl
基因组DNA洗脱液（或者TE）	3 ml

2. 用吸头上下吹打混匀。在55°C下孵育1-3小时。
3. 添加1倍体积的基因组DNA裂解液到消化的样品中，用吸头上下吹打混匀或者涡旋。在进行下述操作前，确保样品完全匀浆。

注意：用移液器上下吹打混匀确保样品完全匀浆是有必要的。涡旋振荡可辅助增强效果。

4. 从DNA纯化步骤开始继续下面的操作。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
蛋白酶K	TD3001-2-B	20mg	-20°C
蛋白酶K保存液	TD3001-2-D	1.2ml	-20°C
液体与细胞消化液（红）	TD4068-1-45	45ml	室温
基因组DNA裂解液	TD3004-1-150	150ml	室温
基因组DNA洗涤液1	TD3004-5-250	250ml	室温
基因组DNA洗涤液2	TD3004-2-200	200ml	室温
基因组DNA洗脱液	TD3004-3-10	10ml	室温
5号E纯化柱+15漏斗	TC1029-25	25个	室温
2ml收集管	TC1001-50	50个	室温