

操作手册

组织基因组 DNA 中量提取试剂盒

Catalog No. TD328-25 (25 次反应)

Highlights

- 可从 125mg 固体组织，头发等复杂来源的样品中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。

产品组成:

| 试剂盒组成 | 保存 | 25 次 |
|---------------|------|--------|
| 蛋白酶 K 及保存液 | -20℃ | 3x20mg |
| 固体组织消化液（蓝色） | 室温 | 22ml |
| 基因组 DNA 裂解液 | 室温 | 150 ml |
| 基因组 DNA 洗涤液 1 | 室温 | 250 ml |
| 基因组 DNA 洗涤液 2 | 室温 | 200 ml |
| 基因组 DNA 洗脱液 | 室温 | 10 ml |
| 5E 柱套装 | 室温 | 25 个 |
| 收集管（2ml） | 室温 | 50 个 |

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

环境温度低时基因组固体组织消化液或者基因组 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。

特性:

- **样品种类:** 固体组织，毛发，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 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 50 kb 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 $Abs_{260/280} \geq 1.8$ $Abs_{260/230} \geq 2.0$ 。

- **基因组 DNA 产量:** 针对哺乳动物组织可从每 mg 的心脏，脑组织中提取到 1-3 μ g DNA。每 mg 的肝，肾，肺组织中提取到 3-5 μ g 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:

固体样品:

可从≤125mg 尾巴, 耳朵, 器官活检 (脑, 肝, 心脏, 肾, 肌肉, 胃, 膀胱, 肠) 等样品里提取到总 DNA。

- 可采用 55℃ 过夜蛋白酶 K 消化步骤。
- 针对保存在 DNA/RNA 保护剂中的固体组织。参看附录。
- 针对头发, 毛发等组织。参看附录。

试剂制备:

在操作之前, 需添加1060μl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℃长期保存。

提取步骤:

固体组织

1. 添加≤125mg的组织到一个离心管里, 并且添加:

480μl 水

480μl 固体组织消化液 (蓝色)

40μl 蛋白酶K

2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后在55℃下孵育1-3个小时或者直到组织溶解, 进行下一步之前混匀。

注意: 如果消化后的样品中仍然有不溶解的组织, 需要在≥ 12,000 x g 的离心力下离心1分钟, 然后将上清转移到一个干净的离心管中进行下面的操作。

3. 混匀4倍体积的基因组DNA裂解液到上清中, 混匀或者涡旋振荡10-15秒。

例如: 添加4ml的基因组DNA裂解液到1ml上清中。

DNA 纯化步骤（兼容负压和离心两种方式）

| <u>离心操作步骤</u> | <u>负压操作步骤</u> |
|--|---|
| <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, 000 x g 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, 000 x g 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, 000 x g 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连器上，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$\geq 500\text{mm Hg}$.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, 000 x g** 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 **200 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2**，在 **12, 000 x g** 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 **200 μ l 基因组 DNA 洗脱液**到柱基质上。（洗脱液事先在 **65-70 $^{\circ}$ C** 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 **5 分钟**，在 $\geq 10,000 \text{ x g}$ 条件下离心 **1 分钟**来洗脱 **DNA**。

附录A:

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**）

固体组织

1. 添加 0.5 体积的固体组织消化液（蓝色）和 20 μ l 蛋白酶 K 到每 1 体积含有样品的保护剂中（组织 \leq 125mg）。
2. 混匀或者涡旋 10-15 秒并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1-3 小时。
注意：55 $^{\circ}$ C 下过夜操作也是可以的，并且可以增强消化的效果和 DNA 的回收量。
3. 在 \geq 12,000 x g 离心力下离心 1 分钟添加 1 倍体积的基因组 DNA 结合液到消化的样品中，混匀或者涡旋 10-15 秒。
4. 从主操作步骤的第 5 步开始进行接下来的操作。

附录D：

头发，毛发等相关样品

1. 需要用到新鲜制备的 DTT(未提供)进行溶液的配置，提取 \leq 25mg 的样品配置比例如下：

| | |
|------------------|------------|
| H ₂ O | 90 μ l |
| 固体组织消化液（蓝色） | 90 μ l |
| DTT(1M) | 10 μ l |
| 蛋白酶K | 10 μ l |

2. 混匀或者涡旋 10-15 秒并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1-3 小时。
注意：55 $^{\circ}$ C 下过夜操作也是可以的，并且可以增强消化的效果和 DNA 的回收量。
3. 添加400 μ l的基因组DNA结合液到消化的样品中，混匀或者涡旋振荡10-15秒。在 \geq 12,000 x g离心力下离心1分钟沉淀不溶的物质。
4. 将混合物（上清）转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在 \geq 12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。
5. 将 2L 柱套在一个新的收集管里，添加 400 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在 \geq 12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
6. 添加 700 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 \geq 12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 \geq 12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。

8. 将 2L 柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 $\geq 50\mu\text{l}$ 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热效果更好），室温下放置 2-5 分钟，全速离心 1 分钟来洗脱基因组 DNA。

附录F：

保存在保存卡（纸）上的样品

将保存在 Guthrie, FTA 或其他类似的样品保存卡（纸）上的样品通过合适的穿孔器打孔，将裁切的介质添加到我公司的裂解管中（需额外购买），并且添加裂解液（需额外购买），简单涡旋匀浆后进行下述操作。

1. 添加保存卡（纸）到裂解管中，添加 400 μl 裂解液。
2. 拧紧盖子放到合适的振荡器中最大速度下震荡。
3. 在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心裂解管 1 分钟。
4. 针对裂解管里的裂解物添加以下混合物：

| | |
|-------------|-------------------|
| 固体组织消化液（蓝色） | 360 μl |
| 蛋白酶K | 40 μl |

5. 混匀并在 55°C 下孵育 10-15 分钟。
6. 在 $\geq 10,000 \times g$ 离心力下离心裂解管 1 分钟。将 400 μl 上清移至一个干净的离心管里。
7. 添加 800 μl 的基因组 DNA 结合液到离心管内混匀。
8. 转移 600 μl 上述混合物到转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。
9. 倒掉收集管中的废液并且重复步骤 8。
10. 将 2L 柱套在一个新的收集管里，添加 400 μl 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
11. 添加 700 μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
12. 添加 200 μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。
13. 将 2L 柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 $\geq 50\mu\text{l}$ 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热效果更好），室温下放置 2-5 分钟，全速离心 1 分钟来洗脱基因组 DNA。