

版本号: 240204

Universal genomic DNA Kit**通用全血/组织/细胞/细菌 DNA 快速提取试剂盒**

目录号: DN10

❖ 适用范围:

适用于抗凝全血/组织/细胞/鼠尾/细菌等基因组DNA。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DN1001)	100 次 (DN1002)	200 次 (DN1003)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
裂解液 TL	室温	11 ml	20 ml	40 ml
结合液 CB	室温	15 ml	30 ml	60 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加入无水乙醇	32 ml	64 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加入无水乙醇	25 ml	50 ml
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	10 ml	20 ml
蛋白酶 K 溶液	4°C	1 ml	1 ml×2	1 ml×4
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 裂解液 TL、结合液 CB 低温时可能出现析出和沉淀, 可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解, **恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输。收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, -20°C 保存 2 年。
3. 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。

❖ 产品介绍：

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞，利用硅胶膜离心柱特异地吸附 DNA，无需酚氯仿等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，最大限度的去除蛋白及其他抑制性杂质。适用于从多种材料(全血、动物组织细胞、鼠尾、大肠杆菌等)中高效地提取基因组 DNA。提取的 DNA 可直接用于酶切、PCR、Southern Blot、病毒检测等实验。

❖ 产品特点：

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要耗时的乙醇沉淀等。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，典型的产量 200 μ l 全血可提取出 3-6 μ g 基因组 DNA。OD₂₆₀/ OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30 kb-50 kb，可直接用于 PCR、Southern-blot 和各种酶切反应。
4. 从十几个配方中优选出的红细胞裂解液配方，裂解快速完全，客户可根据需要选择购买。

❖ 注意事项：

1. **所有的离心均在室温完成**，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
2. 需要自备异丙醇(添加异丙醇的步骤，首选推荐使用异丙醇，没有异丙醇也可以用乙醇替代)。生理盐水 0.9% 氯化钠溶液或者 1×PBS 磷酸盐缓冲液（可选），RNase A（可选）溶菌酶（用于革兰氏阳性菌，可选）。
3. 不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此产量的个体差异也可能非常大。
4. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70°C 备用。
5. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4°C 存放少于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。

❖ 关于平衡液的使用

1. 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。
2. 使用方法：（临用前才预处理）取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

- ⇒ 第一次使用前按照漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶子标签指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

平衡液预处理吸附柱备用：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

1. 全血

a. 取 200 μl 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，放入 1.5 ml 离心管。

▲ 如果全血起始量小于 200 μl ，则用生理盐水或者 1 \times PBS 补足到 200 μl 。如果起始量介于 200 μl -300 μl 之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于 300 μl -1 ml 之间，则需要先进行红细胞裂解操作（见本说明书后附录）。

▲ 如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量仅用 5-20 μl ，可加 1 \times PBS 补足到 200 μl 后进行后续步骤。

b. 加入 20 μl 蛋白酶 K 溶液，充分混匀，再加入 200 μl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min。溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

▲ **可选步骤，一般不需要**：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μl 结合液 CB 前加 5 μl RNase A (100 mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

c. 冷却后加 100 μl 异丙醇（也可以用无水乙醇替代，以下同），**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

▲上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 sec 混匀。

d. 将上一步混合物(包括可能有的沉淀)都加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 13, 000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

e. 接操作步骤项下 6。

2. 组织培养细胞

a. 收集约 10^5 – 10^6 悬浮细胞到一个 1.5 ml 离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b. 13, 000 rpm 离心 10 sec，使细胞沉淀下来。吸弃上清，留下细胞团。

c. 加 200 μ l 1 \times PBS 重悬洗涤细胞，13, 000 rpm 离心 10 sec，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，将细胞沉淀重悬于 180 μ l 1 \times PBS 中。

d. 加入 20 μ l 蛋白酶 K 溶液，充分混匀，再加入 200 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

▲**可选做步骤**：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μ l 结合液 CB 前加 5 μ l RNase A (100 mg/ ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5–10 min。

e. 冷却后加 100 μ l 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13, 000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤项下 6。

3. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）

a. 将 20–50 mg 新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有 180 μ l 组织裂解液 TL 的 1.5 ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ l 蛋白酶 K，立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴 1–3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

▲**可选做步骤**：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 5 μ l

RNase A (100 mg/ ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

d. 加入 200 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70°C 放置 10 min。

e. 冷却后加 100 μ l 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

▲如果有不溶组织物可能堵住吸头，可将吸头在吸水纸上轻蹭去除不溶物；如果吸上来的混合物少则可以将吸头和不溶物一起弃去，该做法是为了去除不溶物，以免堵塞离心柱。

g. 接操作步骤项下 6。

4. 动物组织（鼠尾）

a. 将 0.2-0.5 cm 的鼠尾巴尖(即 20-50 mg)剪碎（**一定要剪 0-2cm 范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好**），或者在液氮中研磨成细粉后，转入装有 180 μ l 组织裂解液 TL 的 1.5 ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ l 蛋白酶 K，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

c. 将裂解物放置在 55°C 水浴 3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

▲**可选做步骤：** 如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 5 μ l RNase A (100 mg/ ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

d. 可选做：用剪大口径的吸头抽打裂解物 2-3 次帮助裂解。

e. 加入 200 μ l 结合液 CB 和 100 μ l 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

f. 13,000 rpm 离心 5 min，将上清加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤项下 6。

▲上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 sec 混匀。

5. 细菌

a. 取 0.5–2 ml 培养菌液（最多不超过 2×10^9 个细胞），13,000 rpm，离心 30 sec，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

▲起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整，但是离心吸附柱最大吸附能力是 30 μg 基因组 DNA，如果菌体过量超过最大吸附能力，反而会严重降低产量。

b. 加入 200 μl 生理盐水或者 $1 \times \text{PBS}$ 重悬，13,000 rpm 离心 30 sec，吸弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 180 μl $1 \times \text{PBS}$ 中。

▲注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过 b 步骤，加入溶菌酶进行破壁处理，具体方法为：加入 180 μl 缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100; 临用前加入终浓度为 20 mg/ml 的溶菌酶(溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制，否则会导致溶菌酶无活性))，37°C 处理 30 min 以上。

c. 加入 20 μl 蛋白酶 K 溶液，充分混匀，再加入 200 μl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70°C 放置 10 min。

▲**可选做步骤**：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μl 结合液 CB 前加 5 μl RNase A (100 mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5–10 min。

d. 冷却后加 100 μl 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

e. 将上一步混合物（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

f. 接操作步骤项下 6。

6. 加入 500 μl 去蛋白液 PE **(请先检查是否已加入无水乙醇!)**，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。

7. 加入 600 μl 漂洗液 WB **(请先检查是否已加入无水乙醇!)**，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。

8. 重复步骤 7 一遍。

9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 50–100

μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 80–100°C 水浴中预热可以提高产量），室温放置 3–5 min，13,000 rpm 离心 1 min。

▲可将第一次洗脱所得溶液重新加入离心柱中，室温放置 2 min，13,000 rpm 离心 1 min。可以提高浓度 10%左右。

▲洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 30μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

11. DNA 可以存放在 -20°C，如果要长时间存放，可以放置在 -70°C。

12. 附录（以 300 μl，1 ml 全血举例红细胞裂解操作）：

1. 吸取 900 μl 1×红细胞裂解液到一个 1.5 ml 离心管或者 3 ml 红细胞裂解液到一个 15 ml 离心管。（1×红细胞裂解液可向本公司购买）
2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300 μl 全血和 1 ml 全血分别加到上述 1.5 ml 和 15 ml 离心管中，颠倒 6–8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。
3. 室温放置 10 min（期间应该颠倒轻弹混匀数次，帮助裂解红细胞）。
4. 13,000 rpm 离心 20 sec（对于 1.5 ml 离心管）或 2,000–3,000 rpm 离心 5 min（对于 15ml 离心管），倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约 10 μl 的残留上清。

▲离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复 3，4。

5. 加入 200 μl 1×PBS 涡旋振荡重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

▲其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响后续实验裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。

6. 现在可以按照操作提取全血基因组 DNA 了。