

# 基因组 DNA 快速提取试剂盒 (硅胶膜离心柱法)

## 产品组分

| 组分       | N1111 | N1112 |
|----------|-------|-------|
| 消化缓冲液 DS | 15 ml | 30 ml |
| 裂解液 MS   | 20 ml | 40 ml |
| 蛋白酶 K    | 1 ml  | 2 ml  |
| 去蛋白液 PS  | 30 ml | 60 ml |
| 漂洗液 PE   | 15 ml | 30 ml |
| 纯化液 TE   | 5 ml  | 10 ml |
| DNA 纯化柱  | 50 个  | 100 个 |
| 说明书      | 1 份   | 1 份   |

- 裂解液 MS 中含变性剂, 请不要直接接触皮肤。
- 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:3 稀释, 即含 75%乙醇。

## 产品说明

本产品可用于昆虫、线虫、动物等样本的基因组 DNA 纯化。纯化原理是利用细胞裂解液裂解细胞核释放基因组 DNA, 由硅胶膜柱可逆吸附体系中的基因组 DNA, 经蛋白酶 K 消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质, 用纯化液洗脱获得基因组 DNA。一次可从不超过 10 mg 组织材料中提取到 3-35  $\mu\text{g}$  的高纯度基因组 DNA ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.7-1.9$ ), 此基因组 DNA 可直接用于 PCR、酶切等后续实验。

## 质量控制

纯化的基因组 DNA 质量通过限制性酶切和单拷贝基因的 PCR 扩增鉴定。

## 保存条件

蛋白酶 K 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

其余试剂置于室温 ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) 干燥条件下保存 1 年。

如果消化缓冲液 DS 和 MS 中有沉淀, 可在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 的纯化效率。

## 注意事项

- 漂洗液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入 3 倍体积的无水乙醇, 即 15 ml 漂洗液 PE 加入 45 ml 无水乙醇, 30 ml 漂洗液 PE 加入 90 ml 无水乙醇, 使用后立即盖紧盖子。
- 消化缓冲液 DS 和裂解液 MS 室温保存可能会有沉淀产生, 在  $55^{\circ}\text{C}$  加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 纯化效率。
- 应尽量使用新鲜的实验材料, 确保提取的基因组 DNA 不被降解。不能立刻提取基因组 DNA 的实验材料应尽快置于液氮或  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存并避免反复冻融。
- 使用液氮研磨组织材料时, 应随时加入液氮, 确保提取的基因组 DNA 不被降解。
- 基因组 DNA 需长期保存时, 建议使用纯化液 TE。用无菌的离心管分装后保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$ 。
- 所有离心步骤均为室温下进行。
- 请严格按照操作步骤操作。

## 操作步骤

1 取少量样本材料，放入液氮预冷的研钵中。快速用力研磨的同时加入少量液氮，直至样本材料被研磨成粉末。将研磨好的样本转移至 1.5 ml 离心管中，每管组织材料含量应不超过 10 mg。

● 如没有液氮，可用剪刀剪成小块，放入研钵或匀浆器中，加入适量 TE (pH 8.0)，处理成细胞悬液。将不超过 10 mg 当量的细胞悬液转移至一个新的 1.5 ml 的离心管中，12,000 rpm 离心 1min，弃上清，收集沉淀。

● 每支离心管中的样本当量不宜超过 10 mg。每 10 mg 样本材料可获得 10 µg 基因组 DNA。样本量过大，将会影响细胞核裂解效率并可能堵塞纯化柱，进而降低基因组 DNA 的得率与纯度。

2 加入 200 µl 消化缓冲液 DS，漩涡振荡至形成完全均一的悬浮液。

● 如需去除 RNA，可加入 4 µl RNase A (100 mg/ml)，振荡 15 秒，室温放置 5min。

3 加入 20 µl 蛋白酶 K，混匀，55℃水浴或金属浴，至组织完全溶解，通常需要 1-3 小时。对特别难溶解的组织如尾巴、昆虫可放置过夜。

4 加入 220 µl 裂解液 MS，漩涡振荡混匀。65℃温浴 10min。溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

● 加入裂解液 MS 时可能会产生白色沉淀，一般 65℃放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。

5 加入 220 µl 无水乙醇，上下颠倒混匀。此时可能出现絮状沉淀。简短离心以去除管盖内壁的水珠。将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中。12,000rpm 离心 1min，弃滤液。

● 此时基因组 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。

6 加入 500 µl 去蛋白液 PS，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。

● 此步骤的作用是去除硅胶膜上吸附的蛋白、脂质等杂质，以获得高质量基因组 DNA。

7 加入 500µl 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。

● 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 3 稀释，即含 75%乙醇。

8 加入 500 µl 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。

9 12,000 rpm 离心 3min，以彻底去除纯化柱中残留的液体。

● 此步骤的作用是去除残留乙醇，避免影响后续的酶促反应 (PCR 或酶切)。同时利于基因组 DNA 充分溶解。

10 将纯化柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱中央处，悬空滴加 30-100µl 洗脱液 TE。室温放置 2min。

11 12,000 rpm 离心 2min，管底即为高纯度基因组 DNA。-20℃保存。

● 洗脱液 TE 可用去离子水代替，但其 pH 需为 8.0-8.5。

● 对洗脱液 TE 60℃预热，会提高基因组 DNA 的产量。

## Q&A

**问：基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA，为什么？**

答：基因组 DNA 收率较低时，可以从以下几个方面考虑：

- 1 实验材料太少，如  $2 \times 10^3$  培养细胞的基因组就不能用电泳检测到。
- 2 样本未处理成细胞悬液，有太多成块的组织，建议要加入液氮充分研磨材料。
- 3 研磨样本时间过长，导致内源性 DNA 酶完全降解 DNA。
- 4 收集培养细胞时离心力偏小，当细胞数量小于  $10^5$  时，可以适当提高离心力。
- 5 洗脱时对纯化液 TE 60℃预热，会提高基因组 DNA 的产量。
- 6 蛋白酶 K 水浴时间太短，延长处理时间。

**问：提取的基因组 DNA 有降解，为什么？**

答：1 选球的实验材料不够新鲜，采集后的组织材料未及时处理或未低温保存，我们建议材料应尽量在 -80℃ 保存，运输过程中亦使用干冰等。

2 研磨样本时间过长，导致内源性 DNA 酶降解 DNA。样本处理得相对分散即可，难处理的组织可以延长蛋白酶 K 的处理时间。