

海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒

产品组分

| 组分 | N1171 | N1172 | N1173 |
|----------|-------|-------|---------|
| 消化缓冲液 DS | 15 ml | 30ml | 60 ml |
| 裂解液 MS | 20 ml | 40ml | 80 ml |
| 蛋白酶 K | 1 ml | 2ml | 4 ml |
| 去蛋白液 PS | 30 ml | 60ml | 120 ml |
| 漂洗液 PE | 15 ml | 30ml | 30 ml×2 |
| 纯化液 TE | 5 ml | 10ml | 20 ml |
| DNA 纯化柱 | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 说明书 | 1 份 | 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

本产品用于多种动物组织（新鲜或冻存）与培养细胞等样本的基因组 DNA 的纯化。已成功提取鱼类、虾类、贝类、蟹类等海洋动物组织基因组 DNA。其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基因组 DNA，经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质后，用纯化液洗脱获得基因组 DNA。本产品可从不超过 10 mg 组织材料中提取到 3-35 μ g 超纯基因组 DNA ($OD_{260}/OD_{280} = 1.7-1.9$)，此基因组 DNA 可直接用于 PCR、酶切、文库构建等后续实验。

质量控制

纯化的基因组 DNA 质量通过限制性酶切和单拷基因的 PCR 扩增鉴定。

保存条件

蛋白酶 K 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

其余试剂置于室温（15-25 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。
- 所有离心步骤均为室温进行。
- 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。

如果没有液氮，尽快将组织切小置于离心管，进入下一步。

● 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 μ g 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 μ l 消化缓冲液 DS，漩涡振荡 15 s。

● 如需去除 RNA，可加入 4 μ l RNase A (100 mg/ml)，振荡混匀，室温放置 5min。

3 加入 20 μ l 蛋白酶 K，漩涡振荡混匀。55 $^{\circ}$ C 水浴或金属浴至溶液变清亮，通常需要 1-3 小时（期间可适当颠倒几次，温浴后简短离心以去除管盖内壁的水珠）。

4 加入 220 μ l 裂解液 MS 充分颠倒混匀，65 $^{\circ}$ C 温浴 10 min，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 $^{\circ}$ C 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 μ l 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 μ l 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 500 μ l 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 μ l 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 30-100 μ l 洗脱液 TE，室温放置 2min，12,000 rpm 离心 2min，管底即为高纯度基因组 DNA。-20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 2×10^3 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 洗脱时对纯化液 TE 60 $^{\circ}$ C 预热，会提高基因组 DNA 的产量。
- 5 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 选取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 $^{\circ}$ C 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。样本处理的相对分散即可，难处理的组织可以延长蛋白酶 K 的处理时间。