

细胞/组织/血液基因组 DNA 提取试剂盒 (柱式)

货号: NG416S 100 次
NG416M 200 次

试剂盒组成	保存	100 次	200 次
1×PBS	室温	40ml	80ml
裂解液 HTL	室温	20 ml	40 ml
结合液 HB	室温	20 ml	40 ml
抑制物去除液 IR	室温	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml	20ml
蛋白酶 K(20mg/ml)	-20°C	2×20mg	4×20mg
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

储存事项:

- 结合液 HB 或者抑制物去除液 IR 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。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、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 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶, 然后基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

注意事项

- 所有的离心步骤均在室温完成, 离心机转速需达到 13,000rpm。
- 需要自备异丙醇。
- 实验前将需要的水浴先预热到 70°C 备用。
- 结合液 HB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱, 但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20°C。DNA 如果需要长期保存, 可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 但是 EDTA 可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示: 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇, 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!

一: 组织培养细胞

- 收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个 1.5ml 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。12,000rpm 离心 10 秒, 使细胞沉淀下来。弃上清, 留下细胞团和大约 10-20 μ l 残留的液体。加 200 μ l 1XPBS 重悬洗涤细胞, 12,000rpm 离心 10 秒, 使细胞沉淀下来。完全吸弃上清, 将细胞沉淀重悬于 180 μ l HTL 中,
- 加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液, 立刻涡旋振荡充分混匀,
- 将裂解物放置在 56°C 水浴 10min 或者直到样品消化完全, 期间轻柔的振荡几次帮助裂解。接 d 步

二: 动物组织

- 新鲜或者解冻的组织在液氮中研磨成细粉后取 20-50mg, 转入装有 180 μ l 组织裂解液 HTL 的 1.5ml 离心管中,

用大口径枪头吹打混匀。

- b. 加入 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml), 充分混匀。
- c. 将裂解物放置在 56 $^{\circ}$ 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。接 d 步

三: 动物组织 (鼠尾)

- a. 将 0.2-0.5cm 的鼠尾巴尖(即 20-50mg)剪碎, 在液氮中研磨组织成细粉后, 转入装有 180 μ l 组织裂解液 HTL 的 1.5ml 离心管中, 用大口径枪头吹打混匀。
- b. 加入 20 μ l 的蛋白酶 K(20mg/ml), 立刻涡旋振荡充分混匀。
- c. 将裂解物放置在 56 $^{\circ}$ 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。接 d 步

四: 血液 (全血) 样本

- a. 取 200 μ l 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液, 转入装有 180 μ l 组织裂解液 HTL 的 1.5ml 离心管中, 用大口径枪头吹打混匀。

注: 如果全血起始量小于 200 μ l, 则用 1 \times PBS 补足到 200 μ l。如果起始量介于 200 μ l - 300 μ l 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 μ l-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 I)。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 μ l, 可加 1 \times PBS 补足到 200 μ l。再加入 180 μ l 裂解液 HTL 后进行后续步骤。

- b. 加入 20 μ l 蛋白酶 K 溶液, 充分混匀,
- c. 将裂解物放置在 56 $^{\circ}$ C 水浴 10min 或者直到样品消化完全, 期间轻柔的振荡几次帮助裂解。接 d 步

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 20 μ l RNase A(10mg/ml)溶液, 振荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。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 秒混匀。

- d. 再加入 200 μ l 结合液 HB, 立刻 涡旋振荡充分混匀, 在 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。
- e. 冷却后加 200 μ l 无水乙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。
- f. 将上一步混合物加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 12,000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
2. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
3. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
4. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
5. 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 μ l-80 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温放置 3-5 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

附录 I 大体积血液 (全血) 裂解: 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

1. 吸取 900 μ l ddH₂O 和 100 μ l 10x 红细胞裂解液(NGC24)单独采购。(稀释到 1x)到一个 1.5ml 离心管。
2. 将抗凝全血 (使用前回复到室温) 颠倒混匀后, 吸取 300 μ l 加到上步装有红细胞裂解液的离心管中, 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. 12,000 rpm 离心 20 sec, 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 50 μ l 的残留上清。

注: 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, 应该重复步骤 1-3 操作, 重新裂解红细胞。涡旋振荡直到白细胞团充分重悬、分散。白细胞的重新分散对下一步裂解非常重要, 白细胞未打散就加入细胞核裂解液, 会导致白细胞不能充分裂解, 形成肉眼可见团块。