

版本号: 230104

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 |
| 抑制物去除液 IR | 室温 | 25 ml | 50 ml | 100 ml |
| 漂洗液 WB | 室温 | 13 ml | 25 ml | 50 ml |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 15 ml | 15 ml | 20 ml |
| 蛋白酶 K 溶液 | 4°C | 1 ml | 1ml × 2 | 1ml × 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、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。**
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. 需要自备乙醇，异丙醇，1 \times 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 $^{\circ}$ C 备用。
5. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4 $^{\circ}$ 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 分钟，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）**

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！

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 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 $^{\circ}$ 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），10,000 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 μ g 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 μ l 1 \times PBS 重悬，10,000 rpm 离心 30 sec，吸弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 180 μ l 1 \times 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 μ l 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 $^{\circ}$ C 处理 30 min 以上。

c. 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。

d. 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。

e. 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。

f. 接操作步骤项下 6。

6. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。

7. 加入 600 μ l 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 100 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 80 - 100 $^{\circ}$ 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 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

11. DNA 可以存放在 -20 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -70 $^{\circ}$ C。

12. 附录（以 300 μ l，1 ml 全血举例红细胞裂解操作）：

1. 吸取 900 μ l 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。（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 μ l 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 μ l 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 μ l 1 \times 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。