

动物基因组 DNA 小量提取试剂盒

Catalog No.	EM2201-01	EM2201-02
Size	20T	50T

简介

本试剂盒用于多种动物细胞材料的基因组DNA的提取。该试剂盒提供的方法简单易行，通过蛋白酶K处理和特殊的液体系统将裂解细胞后产生的DNA结合在柱材上，避免酚仿抽提。所获的基因组DNA具有完整性好、产量大、纯度高和稳定性好等特点。可以满足PCR、酶切、分子杂交和文库构建等各种分子生物学实验需要。

试剂盒组成 <20次><50次>

离心柱及收集管	各 20 支/50 支				
裂解液 GDL	6 ml/15ml	缓冲液 GDB	6 ml/12ml	蛋白清洗液 PWB	12 ml/28ml
洗涤液 WB	20ml/20ml	蛋白酶 K	340μl/800μl	洗脱液 EB	15 ml/15ml

需自备的试剂

无水乙醇，RNase A(25mg/ml)和无菌的等渗盐溶液（0.15mol/L NaCl溶液或PBS液）。

保存条件及有效期

试剂盒保存在室温（15-30℃）。试剂如出现混浊或结晶，可以将试剂瓶置于 55℃水浴加热，溶液变清亮后再使用。本试剂盒有效期为 12 个月。蛋白酶 K 含 50%的甘油和稳定剂，请置于-20℃可保存更长时间。

操作步骤

所有离心步骤皆使用台式离心机，为室温下操作。

第一次使用前请先参考试剂瓶上的标签，在洗涤液WB中加入无水乙醇。

1. 动物材料处理

1a. 血液

在1.5ml离心管中加入15μl蛋白酶K，加入100-200μl无核红细胞血液（或5-10μl有核红细胞血液），用无菌PBS，TE或0.15mol/L的NaCl补足220μl，振荡混匀。为去除RNA可加入5μlRNase A（25mg/ml），振荡混匀。然后按步骤4a进行。当无核红细胞血液量大于200μl时，需用红细胞裂解液处理掉红细胞，获得的白细胞可按组织培养细胞提取方法进行。

1b. 组织培养细胞

离心收集不超过 5×10^6 个的细胞（贴壁培养的细胞应先用胰酶消化成单个细胞后），离心收集到的细胞沉淀用1mlPBS重悬并将细胞悬液转移到1.5ml离心管中，再次离心，弃上清，加入200μl裂解液GDL重悬细胞。对于倍性较高的细胞如HeLa细胞，应使用较少的细胞，取 $1-2 \times 10^6$ 个细胞。加入200μl裂解液GDL，彻底悬浮。

1c. 动物组织

取不超过25mg的组织，脾不超过10mg，0.5cm的大鼠尾尖或1cm小鼠尾尖，50mg左右的昆虫（如果蝇，蝗虫等），25mg左右的鱼鳍（金鱼、斑马鱼等）。对于组织可参考以下三种预处理方法。

动物基因组DNA小量提取试剂盒

- (1) 剪切成尽可能小的碎片，加入200 μ l裂解液GDL。使组织小块彻底浸没在液体中。
- (2) 用组织匀浆器匀浆。研磨好的匀浆液转入到1.5ml离心管中，加入200 μ l裂解液GDL。
- (3) 组织块用液氮冷冻，在研钵研磨成粉状，将研磨好的粉状物转移到1.5ml离心管中，加入200 μ l裂解液GDL。

置于55 $^{\circ}$ C水浴中消化处理。

2. 提取组织培养细胞和动物组织DNA时为清除RNA，加入5 μ l RNase A (25mg/ml)，振荡混匀。
3. 加入15 μ l蛋白酶K，振荡混匀。
- 4a. 提取血液和培养细胞中的DNA时，可以直接加入220 μ l缓冲液GDB，颠倒离心管充分混匀。然后进入步骤5。
- 4b. 提取动物组织块DNA时，组织块消化时间一般持续1-2个小时，鼠尾可以消化过夜。消化结束时，12,000rpm离心1分钟以除掉未消化掉的类似于鼠毛或昆虫外骨骼等组织，用宽口吸头将上清转移到一个新离心管中，再加入220 μ l缓冲液GDB，充分混匀。然后进入步骤5。
5. 加入缓冲液GDB并充分混匀后，置于70 $^{\circ}$ C水浴15分钟。等溶液变清亮(血液样品为紫黑色)。12,000rpm离心数秒。
6. 加入220 μ l的无水乙醇，剧烈振荡混匀数秒，此时可能会出现絮状沉淀。
7. 将离心柱装在收集管上，然后将所得溶液及沉淀都转移入离心柱中。12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的滤液。
8. 加入500 μ l蛋白清洗液PWB，12,000rpm离心1分钟。倒掉收集管中的滤液。并将离心柱放回收集管中。
9. 加入500 μ l洗涤液WB，12,000rpm离心30秒。(使用前请检查是否已经加入无水乙醇)倒掉收集管中的滤液。并将离心柱放回收集管中。
10. 重复步骤9的操作一次。
11. 12,000rpm离心1分钟，去掉离心柱中的所有液体。将离心柱放在一个干净的新的1.5ml离心管中，置于37 $^{\circ}$ C烘箱放置5-10分钟，待管中的乙醇全部挥发为止。
12. 往离心柱中央悬空滴加经70 $^{\circ}$ C水浴预热的100-200 μ l洗脱液EB。室温放置2分钟后，12,000rpm离心30秒，洗脱DNA到离心管中。为了得到更多的DNA，可以再加100-200 μ l洗脱液EB，室温放置2分钟后，再次洗脱DNA。
13. 取10 μ l DNA进行0.8%琼脂糖电泳检测提取DNA的完整性和质量。

注意事项

1. 血液样品，尤其是人类血液中含潜在危险致病因子，处理血样时应严格按照世界卫生组织（WHO）或疾病预防控制中心（CDC）制定的相关标准操作程序进行。残留的血样和废弃物请务必按生物危险品（biohazard）等级处理。
2. 本试剂盒采用了直接裂解血液的方法，70℃水浴15分钟具有灭活病原体的功效。直接裂解法提取的DNA包括动物本身基因组、线粒体和寄生在血液中各类病原体的DNA。
3. 样品越新鲜提取的DNA质量越好。反复冻融会导致提取的DNA片段变小。短期保存在2-8℃，长期保存应冻于-70℃。
4. EDTA是极大多数降解DNA的脱氧核糖核酸酶的强烈抑制剂，建议血液抗凝剂使用EDTA，终浓度一般为50-100mmol/L。
5. 人类和哺乳类动物血液中的红细胞（RBC）为无核细胞。人类血液中WBC数量为 $4-10 \times 10^6$ 个/ml，RBC为 $3.5-5.5 \times 10^9$ 个/ml。小鼠血液中WBC为 $4-12 \times 10^3$ 个/ml，RBC为 $7.7-12.5 \times 10^6$ 个/ml，家兔血液中WBC为 $8-11 \times 10^3$ 个/ml，RBC为 $4.5-7 \times 10^6$ 个/ml。鸟类、鱼类、两栖类及爬行类动物血液中的红细胞为有核细胞。有核红细胞的血液起始用量应为无核红细胞血液用量的1/10-1/20。
6. 样品在水浴裂解期间可以偶尔取出样品振荡混匀以加快裂解速度。裂解的时间因组织不同而有所不同，通常为1-3小时。坚硬组织可以直接裂解过夜，裂解过夜对抽提效果无任何负面影响。组织完全裂解后可能呈粘稠状。若呈凝胶状则不可进行下一步操作，否则极可能会堵住离心柱。如果消化过夜仍呈凝胶状，说明样品用量过多，作为补救措施，可以把整个裂解体系放大。
7. 在处理转录活性水平很高的组织如肝和肾时，RNA含量很高，而小鼠尾尖组织中RNA含量不高。在不做RNA清除时总DNA含有少量RNA。如果残余的少量RNA对后续实验没有干扰，可以不进行RNA清除操作步骤，直接进入下一步骤。
8. 一般贴壁培养细胞大概估计量 1cm^2 为 $1-2 \times 10^5$ 个细胞，悬浮培养细胞可以用细胞计数板计数。
9. 新鲜脾组织中脾细胞的分离方法：将脾组织放在一块载玻片的磨砂面上，用手术刀片切几刀，然后用另一块载玻片的磨砂面一压，对挫几下，即可将脾细胞分散开，用适量的无菌PBS把脾细胞从载玻片上冲洗到一个干净培养皿中。再将脾细胞悬液收集到离心管中，离心收集细胞即可。提取方法可按组织培养细胞方法进行。一般6-8周龄小鼠，根据品系不同，可得 $0.5-2 \times 10^8$ 细胞/只脾。要非常注意起始提取细胞量。
10. 加入缓冲液GDB和乙醇后的剧烈振荡不会对DNA造成损伤。
11. RNase A配制：将称好的RNase A完全溶于10mmol/L TrisHCl（pH7.5），0.15 mmol/L NaCl的溶液中，500μl每管分装到1.5ml离心管中。100℃煮10分钟。然后冷却至室温，-20℃保存备用。