

## 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (溶液型)

货号: NG402S 100 次  
NG402M 200 次

试剂盒组成	保存	100 次	200 次
细胞核裂解液	室温	60 ml	120 ml
蛋白沉淀液	室温	20 ml	40 ml
DNA 溶解液	室温	15 ml	30 ml
RNase A(10 mg/ml)	-20°C	200 µl	400 µl
滤柱	室温	100 套	200 套

### 储存事项:

1. 环境温度低时细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出，出现浑浊或者沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，轻轻旋摇，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
2. 蛋白沉淀液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，如果不能完全溶解，也不影响使用效果，直接取用上层溶液即可。
3. 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:

本试剂盒用于快速的从动物细胞/组织中提取基因组 DNA。样品研磨或者匀浆后加入细胞核裂解液，首先在强去污剂或者和蛋白酶 K 协同作用下裂解细胞释放出基因组 DNA，接着加入 RNase A 去除 RNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

### 产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂。
2. 快速，简捷，组织样品操作整个过程可在 1 个小时内完成。
3. 结果稳定，产量高（比离心柱型的产量高一倍以上），OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 50Kb-150kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应以及文库构建。

### 注意事项

1. 所有的离心步骤均在室温完成，离心机转速需达到 13,000 rpm。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、PBS(用于细胞)、液氮研钵/或匀浆器(用于组织)、0.5 M EDTA 和蛋白酶 K(用于鼠尾)、水浴箱。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。

### 操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

1. 组织培养细胞
  1. 收集细胞到一个 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。
  2. 13,000 rpm 离心 10 sec，使细胞沉淀下来，弃上清，留下细胞团和大约 10-50 µl 残留的液体。
  3. 加 200 µl PBS 重悬洗涤细胞，重复上一步骤，高速涡旋振荡重悬细胞团。
  4. 对于细胞核裂解液裂解效果不好的细胞系（例如 PC12 细胞），在做下一步骤前，应该做几次冻融循环：冻于液氮后，在 95°C 水浴融化，重复 4 次。
  5. 加入 600 µl 细胞核裂解液，用大口径的枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打裂解细胞直至看不见细胞团块。
  6. 接操作步骤项下 4。
2. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）
  1. 600 µl 冰预冷的细胞核裂解液加入 10-20 mg 新鲜或者解冻的组织，用小匀浆器匀浆 10 sec，将裂解物转入 1.5 ml 离心管。另一种方法：在液氮中研磨 10-20 mg 组织（植物叶片可以适当多加如用 40 mg）成细粉后，转入装有 600 µl 冰预冷的细胞核裂解液的 1.5 ml 离心管，用大口径枪头吹打混匀。
  2. 将裂解物放置在 65°C 水浴 15-30 min。

3. 接操作步骤项下 4。

3. 动物组织（鼠尾）

1. 处理样品前，先加入 120 $\mu$ l 0.5 M EDTA (pH8.0) 到装有 500 $\mu$ l 细胞核裂解液的 1.5ml 离心管中，混匀后冰预冷备用。
2. 将鼠尾在液氮中研磨成细粉或者将 0.5-1.0cm 的鼠尾巴尖(一定要剪 0-2cm 范围内的尾巴尖, 否则裂解效果不好) 剪碎放入一个 1.5 ml 离心管后，加入 600  $\mu$ l 上步配好的 EDTA/细胞核裂解液。
3. 在加入 20 $\mu$ l 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，颠倒混匀。
4. 55°C水浴 放置过夜，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。或者在一个摇床上 55°C水浴 3 h，每一个小时高速涡旋振荡混匀一次。确保鼠尾裂解完全（没剪碎的鼠尾，可能不能完全裂解，产量会低一些）。

4. 加入 1.8  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) 至裂解物中，颠倒混匀后 37°C温育 15-30m 去除残留 RNA。然后室温冷却至少 5 min 或者冰浴使恢复到室温。

5. 在恢复到室温的裂解物内加入 200  $\mu$ l 蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 sec。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴 5 min。

**因样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA。如果用手振荡混匀，不可以上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA；但是力度也不能太小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开，离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分，最后的产物污染有较大量的蛋白质。因此建议用涡旋振荡器。**

6. 13,000 rpm 离心 5 min。这时应该可以见到管底蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

7. 将上清倒入滤柱中，12,000 rpm 离心 20 sec，收集下滤液到一个新的 1.5 ml 离心管中。

8. 加入等体积的室温异丙醇（约 600  $\mu$ l），颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

**注意：颠倒混匀的时候，棉絮状（丝状）DNA 有时会粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 9，直接 12,000 rpm 离心 1 min，弃上清，然后接步骤 10。**

9. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。

**如果棉絮状（丝状）DNA 沉淀附着有气泡，则会漂浮在液体表面，而不会沉淀下来，要小心避开沉淀吸取上清。**

10. 加入 1ml 70%乙醇，颠倒漂洗 DNA 沉淀，12,000rpm 离心 1min，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，弃上清。

11. 加入 1 ml 70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，12,000 rpm 离心 1 min，弃上清（注意不要把 DNA 沉淀倒掉了），倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇，还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

**注意不要干燥过头，否则 DNA 极其难溶；也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。**

12. 加入 100  $\mu$ l DNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65°C温育 30-60min（不要超过一小时），期间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4°C放置过夜来重新水化 DNA。

13. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 - 20°C。