

水产动物组织 gDNA 提取试剂盒

(离心柱型)

| 产品编号 | 规格 |
|------------|-------|
| 021605-10 | 10 次 |
| 021605-50 | 50 次 |
| 021605-100 | 100 次 |

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心柱和独特的缓冲液系统，提取多种动物（软体动物、水产动物、哺乳动物、节肢类动物、昆虫等）组织中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，能够高效、专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。

一、试剂盒组成、储存条件

| 试剂盒组成 | 保存 | 021605-10 | 021605-50 | 021605-100 |
|-----------------|------|------------|--------------|--------------|
| 纯化次数 | | 10 次 | 50 次 | 100 次 |
| 蛋白酶 K | -20℃ | 20mg/支×1 支 | 20mg/支×1 支 | 20mg/支×2 支 |
| 样品处理液 (ETB) | 室温 | 2mL/瓶×1 瓶 | 10mL/瓶×1 瓶 | 20mL/瓶×1 瓶 |
| 裂解液(Buffer ATL) | 室温 | 5mL/瓶×1 瓶 | 30 mL/瓶×1 瓶 | 60mL/瓶×1 瓶 |
| 洗液 1 (wash1) | 室温 | 6mL /瓶×1 瓶 | 18mL /瓶×1 瓶 | 36 mL /瓶×1 瓶 |
| 洗液 2 (wash2) | 室温 | 2mL /瓶×1 瓶 | 10mL /瓶×1 瓶 | 18mL /瓶×1 瓶 |
| Elution Buffer | 室温 | 1mL /支×1 支 | 10 mL /瓶×1 瓶 | 10 mL /瓶×1 瓶 |
| 离心柱 | 室温 | 10 个 | 50 个 | 100 个 |
| 说明书 | 室温 | 1 份 | 1 份 | 1 份 |

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时,若裂解液(Buffer ATL)产生沉淀,请先将裂解液(Buffer ATL)室温(20-30℃)条件下放置一段时间,必要时可放 37℃水浴中温浴 10 min,以溶解沉淀。蛋白酶 K 收到后请立即使用或放于-20℃下保存,室温放置半个月有效。

二、实验前准备

- 56℃水浴锅或恒温金属浴、涡旋振荡器、掌心离心机
- 蛋白酶 K 溶液需保存-20℃,从冰箱中取出解冻,反复冻融降低蛋白酶 K 活性。
- 使用前,请按下表准确加入 98-100%的乙醇。

| | 10T | 50T | 100T |
|--------------|-----|------|------|
| 洗液 1 (wash1) | 6ml | 18ml | 36ml |
| 乙醇 | 4ml | 12ml | 24ml |

| | 10T | 50T | 100T |
|--------------|-----|------|------|
| 洗液 2 (wash2) | 2ml | 10ml | 18ml |
| 乙醇 | 8ml | 40ml | 42ml |

三、操作步骤 A（离心法）

使用前请先在洗液1（wash1）和洗液2（wash2）中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取组织样品10~20mg，用剪刀剪切成尽量小的碎片，并转移至1.5mL的离心管中。加入200 μ l 样品处理液（Buffer ETB）和20 μ l 蛋白酶 K至样品中。涡旋混匀，56 $^{\circ}$ C水浴3小时或过夜消化样品。水浴期间需偶尔涡旋混匀，或放置于振荡水浴锅中。

（过多的样品会降低产量和纯度。脾脏、肝脏、肾脏等组织不超过 10mg。小鼠尾巴最大用量为 1.2cm，大鼠尾巴最大量为 0.6cm。若消化后还有组织块残留，10000rpm 离心 1min。转移上清 200 μ L 至新的离心管中，按第 2 步操作。注意：不同组织裂解时间不同，通常需 1-3 h 即可完成（鼠尾需要消化过夜）。不会影响 后续操作。每小时颠倒混合样品 2-3 次，用水浴振荡器也可。）

2. (可选) 加入10 μ l RNase（10mg/ml；未提供，需要另购）至消化液中，颠倒混匀，室温或 37 $^{\circ}$ C放置 15~60 分钟。

RNA 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 RNA，需较长的消化时间。

3. (可选)12,000 \times g 离心3 分钟，转移上清液至新的1.5ml 离心管中。

若消化液比较浑浊或存在明显的颗粒，不要省略此步。

4. 加入350 μ l裂解液ATL，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C放置10 min，溶液应变清亮，瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

5. 加入350 μ l无水乙醇，充分振荡混匀15 sec，此时可能会出现絮状沉淀（絮状物为析出的DNA），瞬时离心以去除管盖内壁的水珠。

6. 吸取650 μ l混合液到离心柱上，8000 rpm离心1 min，弃掉收集管中的废液，将离心柱放回收集管中。

7. 将剩下的混合液全部转移到离心柱上，8000 rpm离心1 min，弃掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

8. 向离心柱中加入600 μ l洗液1(Wash 1)（请检查是否已经加入无水乙醇），8000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

9. 向离心柱中加入600 μ l 洗液2(Wash 2)（请检查是否已经加入无水乙醇），8000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的滤液，将离心柱放回收集管中。

10. 12000 rpm 空离心3 min，使吸附膜完全变干。

11. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100 μ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。

12. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20 $^{\circ}$ C保存或立即使用。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入离心柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min。

五、操作步骤 B（负压法）

步骤 1-4 同离心法。

5. 将离心柱连到负压装置（如真空抽滤盒）上，将第4步获得的溶液转移到离心柱中，开启并调节负压至800mba，缓慢吸走液体。
6. 向离心柱依次加入600 μ l洗液1(Wash 1)、600 μ l洗液2(Wash 2)，使用负压装置使得液体通过离心柱。
7. 干抽2min，使得离心柱上的乙醇挥发完全，然后关掉负压装置；
8. 将离心柱放置到新的1.5 mL收集管上，向离心柱中央加入50~100 μ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。
9. 12000 rpm离心2 min，将所得的核酸放置-20 $^{\circ}$ C保存或立即使用。