



## **Ipure 细胞/血液/动物组织 gDNA 提取试剂盒**

### **( 离心柱型 )**

产品编号	规格
K316-S	50 次
K316-L	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 提取多种细胞中的基因组 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	K316-S	K316-L
蛋白酶 K	-20°C	20mg/支×1 支	20mg/支×2 支
裂解液(Buffer ATL)	室温	30 mL/瓶×1 瓶	60mL/瓶×1 瓶
洗液 1 ( wash1 )	室温	18mL /瓶×1 瓶	36 mL /瓶×1 瓶
洗液 2 ( wash2 )	室温	18mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×1 瓶
Elution Buffer	室温	10 mL /瓶×1 瓶	10 mL /瓶×1 瓶
离心柱	室温	50 个	100 个
说明书	室温	1 份	1 份

\*需要但试剂盒未提供的试剂：无水乙醇、1×PBS(pH=7.4)、RNase A ( 10mg/ml )  
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°C ) 条件下放置一段时间，必要时可放 37°C 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°C 下保存，室温放置半个月有效。

## 二、实验前准备

- 56°C 水浴锅或恒温金属浴、涡旋振荡器、掌心离心机
- 溶解蛋白酶 K(20mg/ml):将 1ml 的 1×PBS(pH=7.4)水加入到 1 支蛋白酶 K 干粉中至终浓度 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。蛋白酶 K 干粉在 2-8°C 保存 1 年，蛋白酶 K 溶液须分装保存-20°C。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。

	50T	100T
洗液 1 ( wash1 )	18ml	36ml
乙醇	12ml	24ml

	50T	100T
洗液 2 ( wash2 )	18ml	18ml
乙醇	42ml	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. 处理材料

- a. 如提取材料为血液, 可直接使用200  $\mu$ l新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液, 不足200  $\mu$ l 可加1 $\times$ PBS补足;
  - b. 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, 因此处理样本的体积为5-20  $\mu$ l, 不足200  $\mu$ l部分可加1 $\times$ PBS补足;
  - c. 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液, 然后10,000 rpm( $\sim$ 11,200 $\times$ g)离心1 min, 倒尽上清, 加1 $\times$ PBS 200  $\mu$ l, 彻底涡旋悬浮;
  - d. 动物组织(脾组织用量应少10 mg) 应先打碎处理为细胞悬液, 然后10,000 rpm( $\sim$ 11,200 $\times$ g)离心1 min, 倒尽上清, 加200  $\mu$ l 1 $\times$ PBS, 振荡至彻底悬浮。
2. 加入蛋白酶K 20 $\mu$ l溶液、RNase A 40 $\mu$ l (10mg/ml; 未提供, 需要另购), 涡旋混匀。

(若后续的实验中, RNA的污染会影响结果, 建议按照上述的量加入RNase A)

- ◆ 提取血液基因组时, 只需加入蛋白酶 K、RNase A混匀, 即可继续进行下一步。
- ◆ 提取细胞基因组时, 只需加入蛋白酶 K、RNase A混匀, 即可继续进行下一步。
- ◆ 提取组织基因组时, 加入蛋白酶 K、RNase A混匀后, 在56 $^{\circ}$ C放置, 直至组织溶解, 简短离心以去除管盖内壁的水珠, 再进行下一步骤。

**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。**

3. 加入350  $\mu$ l裂解液ATL, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C放置10 min, 溶液应变清亮, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。
4. 加入350  $\mu$ l无水乙醇, 充分振荡混匀15 sec, 此时可能会出现絮状沉淀, 简短离心以去除管盖内壁的水珠。
5. 吸取650 $\mu$ 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。
6. 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。
7. 向离心柱中加入600 $\mu$ 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。
8. 向离心柱中加入600 $\mu$ 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。
9. 12000 rpm 空离心3 min, 使吸附膜完全变干。

10. 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 $\mu$ l的Elution Buffer，盖好盖子，室温放置3 min。

11. 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  $\mu$ 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ddH<sub>2</sub>O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 $\mu$ l洗液1(Wash 1)、600 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

## 常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>DNA 降解</b>	
电泳条带涂抹	处理过程中，使用无 RNase&DNase 的耗材，样品保证新鲜，避免反复冻融造成样品的降解。
<b>DNA 产量低</b>	
组织裂解不彻底	增加蛋白酶 K 的用量或组织样品减少或尽量将样品粉碎成小块，若样品为全血样本，可延长裂解时间等方法来提高裂解效果。
水产动物组织 DNA 电泳堵孔	水产动物组织（多糖、多酚），请使用我们的磁珠 DNA 纯化试剂盒，对基因组 DNA 进行纯化回收，此类样品不可避免。
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
<b>RNA 污染</b>	
延长 RNase 消化时间	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
<b>OD260/280 或 OD260/230 比值不正常</b>	
RNA 污染	加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染
核酸浓度太低	核酸浓度很低时，OD 比值偏差较大