

# 动物组织 gDNA 提取试剂盒

## ( 离心柱型 )

| 产品编号   | 规格    |
|--------|-------|
| K317-S | 10 次  |
| K317-M | 50 次  |
| K317-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，提取多种动物（软体动物、水产动物、哺乳动物、节肢类动物、昆虫等）组织\细胞中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基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   | K317-S     | K317-M       | K317-L       |
|-----------------|------|------------|--------------|--------------|
| 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          |

\*需要但未提供的试剂：无水乙醇、RNase (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℃) 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200μl 样品处理液（Buffer ETB）和20μl 蛋白酶 K至样品中。涡旋混匀，56℃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 200μL 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10μl RNase （10mg/ml ；未提供，需要另购）至消化液中，颠倒混匀，室温或 37℃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 × 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 μl裂解液ATL，充分颠倒混匀，70℃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 μl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 μl混合液到离心柱上，12000 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，12000 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 μl洗液1(Wash 1)（请检查是否已经加入无水乙醇），12000 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 μl 洗液2(Wash 2)（请检查是否已经加入无水乙醇），12000 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50~100μl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℃保存或立即使用。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 μl，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℃，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×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600μl洗液1(Wash 1)、600μl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50~100μl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℃保存或立即使用。

Surbiopure®

# 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                                                    |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------|
| DNA 降解                      |                                                            |
| 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。            |
| DNA 产量低                     |                                                            |
| 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                              |
| 水产动物组织 DNA                  | 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。 |
| 电泳堵孔                        | 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。   |
| RNA 污染                      |                                                            |
| 延长 RNase 消化时间               | 加入 RNase A 至裂解液中消化去除 RNA 污染                                |
| OD260/280 或 OD260/230 比值不正常 |                                                            |
| 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                                          |