

## 快速通用型基因组 DNA 提取试剂盒说明书

### 产品组成

快速通用型基因组 DNA 提取试剂盒	5 次样品	50 次制备	250 次制备
Cat. No.	3105005	3105050	3105250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
蛋白酶 K 贮存液	120 $\mu$ l	1.2 ml	1.2 ml $\times$ 5
Buffer GE	1.8 ml	18 ml	80 ml
Buffer PE	3 ml	30 ml	130 ml
Buffer WB（浓缩液）	3 ml	19 ml	50 ml $\times$ 2
Buffer TE	3 ml	30 ml	150 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

### 产品储存与有效期

蛋白酶 K 贮存液可室温运输，收到后请置于 -20 $^{\circ}$ C 储存，其他试剂与物品储存于常温（0~30 $^{\circ}$ C），可在两年内保持使用性能无明显变化。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

本产品采用独特的裂解液配合蛋白酶 K 消化各种不同类型的生物样本，释放 DNA，再辅以独创的萃取技术快速去除生物样本中的蛋白水解产物、脂类、多糖、酚衍生物、色素等杂质。特别设计的核酸纯化柱能选择性地吸附萃取水相中的大片段 DNA，小片段核酸则被选择性地滤过除去。核酸纯化柱上吸附的 DNA 仅需用一种洗液洗涤 1~2 次即可获得多至 25  $\mu$ g 的高纯度基因组 DNA。适用于 PCR、Southern 印迹分析、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头（为避免样品间的污染，推荐选用含有滤芯的移液器吸头）
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 水浴锅和旋涡振荡器
6. 可能需要 RNase A（50 mg/ml，Simgen Cat. No. 8001001）

### 使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
2. 将水浴锅温度设置到 56 $^{\circ}$ C，并将 Buffer TE 温育至 56 $^{\circ}$ C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 当室温低于 15 $^{\circ}$ C 时，使用 Buffer GE 和 Buffer PE 前应先观察试剂是否有沉淀产生，如有沉淀则应于 56 $^{\circ}$ C 水浴直至沉淀完全溶解，并颠倒混匀后再使用。

## 操作步骤：

### 样本使用前处理

#### 【从动物组织中提取基因组 DNA】

1. 用手术刀切取 20~50 mg 动物组织，再用刀尖将组织剁成匀浆状，转入一个洁净的 1.5 ml 离心管中。  
\* 下列组织请加液氮研磨至粉末状后，将研钵置于56°C水浴，当粉末开始融化时继续研磨1分钟，匀浆后加入200  $\mu$ l Buffer TE和300  $\mu$ l Buffer GE，继续研磨30秒混匀，吸取所有匀浆液转入一个洁净的1.5 ml离心管中再进入步骤3的操作。  
富含DNA酶的胰脏，脾脏，胸腺，淋巴等组织。  
富含胶原蛋白的皮肤、肌腱等组织。  
富含角质蛋白的组织或坚硬的组织如骨骼等。
2. 加入 150  $\mu$ l Buffer TE、300  $\mu$ l Buffer GE，旋涡振荡 30 秒混合均匀。
3. 加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，56°C水浴 10 分钟。  
\* 未经液氮研磨的组织水浴10分钟后可能会残留有未被溶解的组织颗粒，并不影响后续操作，如果要提高DNA的得率，可延长水浴时间直至组织全部溶解后再进入下一步操作。
4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000 \times g$ ) 离心 1 分钟。

#### 【从植物组织中提取基因组 DNA】

1. 按下表称取适量的新鲜植物组织（若选用的是冷冻干燥的组织，则组织用量减半），剪成小块放入研钵中，加入液氮，使组织冷冻完全后，快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止组织融化，研磨充分后将研钵放入 56°C水浴至样品粉末刚开始融化。加入 300  $\mu$ l Buffer TE，继续研磨 30 秒混匀。

样本类型	推荐用量
植物花或叶片	100-200 mg
植物根、茎、种子	$\leq 240$ mg

- \* 样品研磨应充分，否则严重影响基因组DNA的得率。
2. 转移 200  $\mu$ l 研磨好的匀浆至 1.5 ml 离心管中，如匀浆体积不足 200  $\mu$ l，补加 Buffer TE 至 200  $\mu$ l。  
\* 若匀浆较为粘稠无法吸出，说明样本用量过多，可补加200  $\mu$ l Buffer TE继续研磨混匀，然后再吸取200  $\mu$ l 匀浆进入下一步操作。
3. 加入 300  $\mu$ l Buffer GE 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，立即旋涡振荡 1 分钟混合均匀。56°C 水浴 10 分钟。  
\* 不要将蛋白酶K贮存液直接加到Buffer GE中。  
\* 富含纤维的根/茎等组织或富含淀粉、蛋白质的种子等样品，可延长水浴时间至30分钟。
4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000 \times g$ ) 离心 5 分钟。

#### 【从培养细胞、淋巴细胞、全血或骨髓、骨头中提取基因组 DNA】

- 1a. 悬浮培养的动物细胞或新鲜分离的动物组织单细胞悬液  
300 $\times g$  离心 5 分钟收集约  $5 \times 10^6$  细胞，弃尽上清，加入 200  $\mu$ l Buffer TE 悬浮细胞。

**1b. 贴壁培养的细胞**

弃培养上清，用胰酶消化并悬浮细胞， $300\times g$  离心 5 分钟收集约  $5\times 10^6$  细胞。弃尽上清，加入 200  $\mu$ l Buffer TE 悬浮细胞。

**1c. 淋巴细胞**

收集约  $5\times 10^6$  淋巴细胞，控制细胞悬液在 200  $\mu$ l，如果细胞悬液小于 200  $\mu$ l，补加 Buffer TE 至终体积为 200  $\mu$ l。

**1d. 血液或者骨髓**

收集 200  $\mu$ l 抗凝全血或者骨髓（EDTA 抗凝）。

**1e. 骨骼**

取 50-100 mg 敲碎的骨骼，移入研钵中研磨成匀浆状；加入 300  $\mu$ l Buffer TE，继续研磨 30 秒混匀。吸取 200  $\mu$ l 匀浆液至 1.5 ml 离心管中。

2. 加入 300  $\mu$ l Buffer GE 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液。立即旋涡振荡 30 秒混合均匀。

\* 不要将蛋白酶K贮存液直接加到Buffer GE中。

3. 56°C水浴 10 分钟。

4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000\times g$ ) 离心 1 分钟。

**【从细菌中提取基因组 DNA】**

1. 用 1.5 ml 离心管收集 3~5 ml 细菌培养物，加入 100  $\mu$ l Buffer TE，旋涡振荡充分悬浮细菌。加入 100  $\mu$ l 溶菌酶溶液（Simgen Cat. No. 8009500，用户自备），旋涡振荡约 15 秒混匀，37°C水浴 30 分钟。

\* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如MRS培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入1 ml去离子纯水，旋涡振荡悬浮细菌后 $12,000\times g$ 离心30秒，弃去去离子纯水，再加入100  $\mu$ l Buffer TE，旋涡振荡充分悬浮细菌。

\* 溶菌酶溶液配制方法：按每100 mg溶菌酶加入1 ml去离子纯水的比例配制成100 mg/ml的溶菌酶溶液。

\* 溶菌酶溶液冻融后会严重降低溶菌效率，请尽量使用新鲜配制的或冻融不超过一次的溶菌酶溶液。

2. 加入 300  $\mu$ l Buffer GE 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液。立即旋涡振荡 30 秒混合均匀。

\* 不要将蛋白酶K贮存液直接加到Buffer GE中。

3. 56°C水浴 10 分钟。

4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000\times g$ ) 离心 1 分钟。

**【从酵母中提取基因组 DNA】**

1. 收集过夜培养的酵母菌 5~10 ml 菌液，弃尽上清。加入 100  $\mu$ l Buffer TE，勿弃吸头，直接用吸头吹打菌体沉淀，并将其吸出转入研钵中。倒入液氮浸没菌液（菌液碰到液氮后会立即凝集成块），用力研磨直至菌块呈粉末状。

\* 如果用1.5 ml离心管收集酵母，可以按12000 rpm离心30秒的条件多次离心富集菌体。

\* 如果菌块未能研磨成粉末状，应补加液氮继续研磨，否则将严重影响最终DNA的回收效率。

\* 在没有液氮的条件下，可采用直接研磨约15分钟左右充分破坏细胞壁，在此过程中如果液体被蒸发掉，补加100  $\mu$ l Buffer TE继续研磨。

2. 当研成粉末状的酵母开始融化时，向研钵中加入 100  $\mu$ l Buffer TE 和 2  $\mu$ l RNase A (Simgen Cat. No. 8001001, 用户自备)，继续研磨数次，将裂解物转入 1.5 ml 离心管中，56°C水浴 5 分钟。

\* 如果裂解物少于 200  $\mu$ l, 补加 Buffer TE 至 200  $\mu$ l。

3. 加入 300  $\mu$ l Buffer GE 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液，旋涡振荡 30 秒混匀，56°C水浴 20 分钟。水浴期间每隔 2~3 分钟翻转离心管数次以帮助 DNA 的释放。

\* 不要将蛋白酶 K 贮存液直接加到 Buffer GE 中。

4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000\times g$ ) 离心 1 分钟。

### 【从粪便中提取基因组 DNA】

1. 用 1.5 ml 离心管收集 30~50 mg 粪便，加入 150  $\mu$ l Buffer TE，旋涡振荡直至粪便颗粒全部悬浮。

\* 如果粪便呈液态，则直接吸取 50  $\mu$ l 粪便；如果从小鼠粪便中提取 DNA，可在加入 150  $\mu$ l Buffer TE 后用研磨棒 (Simgen Cat. No. D-050, 用户自备) 研碎粪便颗粒。

2. 加入 300  $\mu$ l Buffer GE 和 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 贮存液。立即旋涡振荡 30 秒混合均匀。

\* 不要将蛋白酶K贮存液直接加到Buffer GE中。

3. 56°C水浴 10 分钟。

4. 加入 500  $\mu$ l Buffer PE，用力摇晃 5~10 次形成乳浊液，再旋涡振荡 30 秒混合均匀，最高速 ( $\geq 12,000\times g$ ) 离心 1 分钟。

### 后续相同的操作步骤

5. 吸取所有上清液加入到核酸纯化柱中 (核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中)，盖上管盖，12,000 $\times g$  离心 30 秒。

\* 宁可少吸取部分上清液也不要吸取相间沉淀物，沉淀物会严重影响最终 DNA 的纯度。

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 800  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，12,000 $\times g$  离心 30 秒。

\* 滤液无需彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

\* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 300  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，最高速 ( $\geq 12,000\times g$ ) 离心 1 分钟。

8. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 100~200  $\mu$ l 56°C温育的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12,000 $\times g$  离心 30 秒。

\* 注意取出核酸纯化柱时不要让滤液触及核酸纯化柱底部，如果核酸纯化柱沾染有滤液，请弃尽滤液重新将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中最高速空离 1 分钟，再取出核酸纯化柱进行此操作步骤。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8,000 $\times g$  离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。