

动物组织 DNA 中量试剂盒说明书

产品组成

动物组织 DNA 中量试剂盒	25 次制备
Cat. No.	3103025
核酸纯化柱	25 套
蛋白酶 K 贮存液	1.2 ml×5
Buffer AT	60 ml
Buffer SL	60 ml
Buffer WA（浓缩液）	56 ml
Buffer WB（浓缩液）	78 ml
Buffer TE	60 ml
说明书	1 份

产品储存与有效期

1. 蛋白酶 K 贮存液可常温（0~30℃）运输和存放，有效期为 12 个月；长期不用可储存于 -20℃，可延长有效期至两年。
2. 其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），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

本产品适合从≤250 mg（脾脏≤100 mg）新鲜的或者是冷冻贮藏的人或动物组织中分离纯化多至 500 μg 总 DNA（包括基因组 DNA、线粒体 DNA 及可能存在的病毒 DNA）。动物组织经蛋白酶 K 消化后，添加乙醇促使 DNA 吸附到纯化柱上，降解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 50 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式离心机（可配离心 50 ml 离心管的转子）
5. 水浴锅、旋涡振荡器和恒温培养箱

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 将水浴锅温度设置到 56℃和 70℃，将 Buffer AT 和 Buffer TE 温育至 56℃。
注意：当室温低于 15℃时，Buffer AT 可能会有白色沉淀析出，温育后请仔细观察沉淀是否完全溶解，并颠倒混匀后再使用。
3. 将恒温培养箱设置到 56℃。
4. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 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。

操作步骤

1. 用一次性手术刀片切取≤250 mg 人或动物组织（脾脏≤100 mg），再用刀尖将组织剁成匀浆状，转移到一个 50 ml 离心管中。

- * 必须将组织剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。
- * 请勿使用超过 250 mg 的组织，否则可能会超出蛋白酶 K 的消化能力上限，或出现纯化柱堵塞等问题。
- * 如果提取的组织中含结缔组织较多，比如皮肤、肌腱、鼠尾等，则应用手术刀刀尖将组织切成尽量小的碎屑，以缩短溶解时间。
- * 上述步骤也可用组织匀浆器进行匀浆，然后将经 Buffer AT 悬浮的组织匀浆液转移到一个 50 ml 离心管中。如果溶液体积不足 2 ml，则应补加 Buffer AT 使匀浆液总体积至 2 ml，再加入 200 μl 蛋白酶 K 贮存液，盖上管盖，旋涡振荡数秒混匀，进入步骤 3 的操作。

2. 加入 200 μl 蛋白酶 K 贮存液，再加入 1.8 ml 56°C 预热的 Buffer AT，盖上管盖，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。

3. 56°C 水浴 30 分钟，期间旋涡振荡数次帮助组织溶解。

- * 如果水浴 30 分钟后发现仍有不可溶解的组织颗粒存在，可延长水浴时间（比如过夜消化）直至组织全部溶解。注意：过夜消化应盖紧管盖，以免长时间水浴的过程中液体大量蒸发。
- * 对于皮肤、肌腱等难以溶解的组织，可将离心管放入恒温混匀器或摇床中 56°C，900 rpm 温育直至组织彻底溶解。
- * 如果从新鲜的组织中提取 DNA，可能会同时获得部分 RNA，但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验。若需去除 RNA，请在本步骤结束后添加 50 μl RNase A（50 mg/ml）（试剂盒不提供，需单独订购，Simgen Cat. No. 8001001），旋涡振荡 30 秒混匀，室温（15–25°C）静置 2 分钟后再进入步骤 4 的操作。

4. 加入 2 ml Buffer SL，盖上管盖，旋涡振荡约 15 秒混匀。将离心管置于 70°C 水浴 15 分钟。

- * 如果此步骤结束后仍有不可溶解的颗粒存在（例如昆虫的外骨骼、未溶解的组织碎片、毛发等），则应于 12000 rpm 离心 1 分钟，吸取上清液到另一个 50 ml 离心管中，弃沉淀物，保留上清液进入步骤 5 的操作。

5. 加入 2 ml 无水乙醇，盖紧管盖，旋涡振荡约 15 秒混匀。

- * 加入无水乙醇后若形成白色絮状沉淀，请在旋涡振荡后将未打散的沉淀一起倒入核酸纯化柱中；若形成胶冻状物质，则需要剧烈摇晃或者用移液器吹打打散胶冻状物质，否则会严重影响最终 DNA 的得率。

6. 将混合液倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，≥4500 rpm 离心 5 分钟。

- * 注意管盖不要拧紧，应留有间隙，以免影响上清液的滤过。

7. 弃 50 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 5 ml Buffer WA，盖上管盖，≥4500 rpm 离心 2 分钟。

- * 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 50 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 10 ml Buffer WB，盖上管盖，≥4500 rpm 离心 2 分钟。

- * 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 50 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 收集管中，≥4500 rpm 离心 15 分钟。

- * 此步骤是为了弃尽残留的乙醇，请勿省略。

- * 如果离心机的最高速可达 10000 rpm 以上，可将离心条件更改为 ≥10000 rpm 离心 5 分钟。

10. 弃 50 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，开盖放入 56°C 恒温培养箱中静置 10 分钟。

11. 在核酸纯化柱中央加 1~2 ml 56°C 温育的 Buffer TE，盖上管盖，56°C 恒温培养箱中静置 5 分钟，≥4500 rpm 离心 2 分钟。

- * Buffer TE 的用量必须大于 1 ml，否则将导致核酸纯化柱上的膜不能被润透，从而降低 DNA 的回收效率。

12. 弃核酸纯化柱，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。