

## 软骨 DNA 纯化试剂盒说明书

### 产品组成

| 软骨 DNA 纯化试剂盒   | 5 次制备       | 50 次制备  |
|----------------|-------------|---------|
| Cat. No.       | 3301005     | 3301050 |
| 核酸纯化柱          | 5 个         | 50 个    |
| 2 ml 离心管       | 5 个         | 50 个    |
| 蛋白酶 K 贮存液      | 120 $\mu$ l | 1.2 ml  |
| Buffer SP      | 100 $\mu$ l | 1 ml    |
| Buffer AT      | 1.5 ml      | 15 ml   |
| Buffer SL      | 1.2 ml      | 12 ml   |
| Buffer WA（浓缩液） | 1.9 ml      | 12 ml   |
| Buffer WB（浓缩液） | 1.5 ml      | 9.5 ml  |
| Buffer TE      | 1.2 ml      | 12 ml   |
| 说明书            | 1 份         | 1 份     |

### 产品储存与有效期

1. 蛋白酶 K 贮存液和 Buffer SP 请于 -20℃ 贮存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上（2~8℃ 储存的产品使用前应先恢复到室温后再使用）。

### 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  $\leq 25$  mg 软骨组织中分离纯化总 DNA（包括基因组 DNA、线粒体 DNA 及可能存在的病毒 DNA）。被溶解的软骨组织经蛋白酶 K 消化后 DNA 将结合到纯化柱上，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. 1.5 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. 台式小量离心机（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

### 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℃。
3. 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. 用手术刀刮去软骨表层，切取中间部分 $\leq 25$  mg软骨组织，再用刀尖将软骨组织切成尽量小的碎屑，转移组织到一个1.5 ml离心管中。

\* 必须将软骨组织切成尽量小的碎屑，方能缩短组织的溶解时间。

\* 勿使用超过25 mg的软骨组织，否则将超出蛋白酶K的消化能力，导致纯化柱堵塞等问题。

2. 加入20  $\mu$ l蛋白酶K贮存液和15  $\mu$ l Buffer SP，再加入180  $\mu$ l 56℃预热的Buffer AT，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。

3. 56℃水浴30分钟，期间旋涡振荡数次帮助软骨溶解。

\* 如果30分钟水浴后发现仍有不可溶解的组织颗粒存在，可延长水浴时间直至组织全部溶解。

4. 加入200  $\mu$ l Buffer SL，旋涡振荡约15秒混匀。将离心管置于70℃水浴10分钟。

\* 如果从非常新鲜的软骨组织中提取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，如需去除RNA，请在本步骤中添加5  $\mu$ l RNase A（Simgen Cat. No. 8001001，用户自备）。

\* 如果此步骤结束后发现有不可溶解的颗粒存在，则应于12000 rpm离心1分钟，吸取上清液转移到另一个1.5 ml离心管中，弃沉淀物，保留上清进入步骤5的操作。

5. 加入200  $\mu$ l无水乙醇，温和地翻转4-6次混合均匀。

6. 吸取步骤5中的溶液加入到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2 ml离心管中），盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

\* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入500  $\mu$ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

\* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

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

8. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600  $\mu$ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

\* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

9. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，14000 rpm离心1分钟。

\* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

\* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

10. 弃2 ml离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入80-100  $\mu$ l 56℃温育的Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

\* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm离心1分钟，以免1.5 ml离心管管盖脱落而损伤离心机。

11. 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℃备用。