

细胞/组织基因组DNA提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取各种动植物细胞/组织基因组DNA

目录号: SG031 (50次) SG032 (100次)

使用手册

2010年12月, 第5版

 **北京三博远志生物技术有限责任公司**
Beijing Sunbiotech Co., Ltd

地 址: 北京海淀区东北旺南路 26 号

电 话: 010-62961251 62976446 传真: 010-62961251

网 址: 阳光生物网 <http://www.sunbiotech.com.cn>

Email: market@sunbiotech.com.cn

 **北京三博远志生物技术有限责任公司**
Beijing Sunbiotech Co., Ltd

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (SG031)	100次 (SG032)
裂解液 SL	室温	10 ml	20 ml
结合液 SB	室温	10 ml	20 ml
漂洗液 PW	室温	15 ml	15mlX2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱液 EB	室温	10 ml	20 ml
蛋白酶 K (20mg/ml)	-20℃	1ml	2ml
吸附柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液 PW 中加入 4 倍体积无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 结合液 SB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在热水中温浴几分钟，恢复澄清后即可使用。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA 产量低	组织块太大，蛋白酶 K 消化不完全	液氮研磨或者尽量将组织切成小块，或者延长蛋白酶 K 消化时间至过夜或者在原有消化基础上另加 20 μ l 蛋白酶 K 消化 1-2 小时。
	蛋白酶 K 失效了	收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。
	裂解不完全或者和无水乙醇没有充分混匀	加入结合液后，和加入蛋白酶 K 后立即吹打混匀。 加入无水乙醇后应该和裂解物充分混匀再加入吸附柱。
组织 DNA 降解了	组织中核酸酶活性导致降解	样品处理前妥善保存在 -20℃，处理量不要过量，
未提取到 DNA	漂洗液 PW 中忘记加无水乙醇	第一次实验时，在漂洗液 PW 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎重沾有乙醇	确保做了步骤 6，否则残留乙醇会影响洗脱效率，
	使用了非最佳液体代替洗脱缓冲液	只使用洗脱缓冲液 EB 或 pH 在 8.0-8.5 之间的去离子水洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 12,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤 6，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

二、原理简介

独特的裂解、缓冲液、蛋白酶 K 配方，可迅速充分裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，基因组 DNA 在高盐状态下选择性吸附于离心柱硅胶膜内，再通过漂洗，将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后用低盐洗脱缓冲液将基因组 DNA 洗脱下来。

三、试剂盒特点

简单快速：一小时内即可获得超纯的基因组DNA。

广泛：适用于血液、多种动物细胞和动物组织等。

超纯：获得的DNA 纯度高，可直接用于PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。

储存时间长：独特的洗脱液EB配方可使DNA长期存放。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 实验前将需要的水浴先预热到 58℃ 备用。

结合液 SB 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。

五、操作步骤

*** 第一次使用前请先在漂洗液 PW 中加入 4 倍无水乙醇！加入体积请参照瓶上的标签。**

1. 组织培养细胞

- a. 收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管，对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 13,000rpm 离心 20 秒，尽量吸弃上清。
- c. 加 200 μ l 缓冲液 SL，加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液，吹打混匀充

分，58℃ 放置 10 分钟，其间颠倒 2-3 次，此时溶液应变清亮，否则，继续放置在 58℃ 直至溶液变清亮。

- d. 加入 220 μ l 结合液 SB，立刻上下颠倒混匀，58℃ 放置 10 分钟，其间颠倒 2-3 次。
- e. 后加入 220 μ l 无水乙醇，充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
- f. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
- g. 接步骤 6 继续。

d. 动物组织

1、取20-50mg（脾组织用量应少于10 mg）新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，应先打碎处理为细胞悬液，然后10,000 rpm (~11,200 \times g)离心1 分钟，倒尽上清，加200 μ l 缓冲液 SL，振荡至彻底悬浮。

*** 注意：如果需要去除RNA，可加入4 μ l RNaseA (100 mg/ml) 溶液（客户自备），振荡15秒，室温放置5分钟。**

2、加入20 μ l 蛋白酶K 溶液，混匀。加入蛋白酶K 混匀后，在58℃ 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 小时即可完成（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220 μ l 结合液SB，充分颠倒混匀，70℃ 放置10 分钟，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

***注意：加入结合液SB时可能会产生白色沉淀，一般70℃ 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。**

4. 冷却后加入220 μ l 无水乙醇，充分振荡混匀15 秒，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. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 秒，倒掉废液，将吸附柱放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入700 μl 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无醇），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

7. 向吸附柱中加入500 μl 漂洗液PW，12,000 rpm (~13,400×g)离心30 秒，倒掉废液。

8. 将吸附柱放回清空的收集管中，12,000 rpm(~13,400×g)空离心2 分钟。将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

***注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。**

9. 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位打入 50-100μl 洗脱液 EB（洗脱缓冲液预先在 70℃水浴中预热），室温放置 3-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

***洗脱体积越大，洗脱效率越高，如需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但最小体积不应少于 50μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，降低 DNA 产量。**

10. 所得基因组 DNA 溶液放置在-20℃保存。