

操作手册

组织基因组 DNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TD325-50 (50 次反应)
TD325-200 (200 次反应)

Highlights

- 可从固体组织，血液，细胞，FFPE，头发等来源的样品中提取到高纯度的基因组 DNA。
- 结合使用蛋白酶 K 消化步骤。
- 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等分子生物学实验。

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	200 次
蛋白酶 K 及保存液	-20°C	2x5mg	2x20mg
2X 消化液	室温	5 ml	20 ml
基因组 DNA 裂解液	室温	50 ml	2X100 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	15 ml	50 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	50 ml	100 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	10 ml	20 ml
2 号柱	室温	50 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	400 个

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

注意事项:

1. 环境温度低时基因组 2X 消化液或者基因组 DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 蛋白酶 K 及其保存液可常温运输。使用前需要添加 260µl 保存液到 TD350 里的蛋白酶 K 里，添加 1040µl 保存液到 TD351 里的蛋白酶 K 里。
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。
4. 推荐：添加 β 巯基乙醇到基因组 DNA 裂解液中，终浓度为 0.5% 例如，250µl 添加到 50mlDNA 裂解液，500µl 添加到 100mlDNA 裂解液里。

特性:

- **样品种类:** 固体组织，全血，细胞，FFPE,毛发等样品。获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用 PCR 等各种分子生物学实验。

一般情况 $Abs_{260/280} \geq 1.8$ 。

- **基因组 DNA 大小:** 一般可回收得到 100bp-40 kb 大小左右的基因组 DNA。如果样品中存在线粒体 DNA，病毒

DNA 等也会一起提取到。

- **DNA 纯度:** 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好， 可以直接用 PCR 等各种分子生物学实验。

一般情况 $Abs_{260/280} \geq 1.8$ 。

- **基因组 DNA 回收情况:** 50 μ l 的洗脱液或水可从每 mg 的心脏， 脑组织中提取到 1-3 μ g DNA。每 mg 的肝， 肾， 肺组织中提取到 3-5 μ g DNA。100 μ l 人全血中回收到 3 μ g 以上的基因组 DNA。
- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴（55 $^{\circ}$ C）。微型离心机， 涡旋仪。

试剂制备:

1. 使用前需要添加260 μ l保存液到TD350里的蛋白酶K里， 添加1040 μ l保存液到TD351里的蛋白酶K里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml
2. 添加 β 巯基乙醇到基因组DNA裂解液中， 终浓度为0.5% 例如， 250 μ l添加到50mlDNA裂解液， 500 μ l添加到100mlDNA裂解液里。

操作步骤:

固体组织

以下步骤是针对从 25mg 新鲜或者冻存的组织中提取到 DNA 设计的。一般产量是：每毫克的骨骼， 心脏和脑组织中可以提取到 1-3 微克的 DNA。每毫克肝， 肾， 肺等组织可以提取到 3-5 微克的组织。对于毛发和 FFPE 样品参照附录的操作步骤

1. 对于固体组织（ ≤ 25 mg）按照以下溶液配比添加到一个离心管中。

H ₂ O	95 μ l
2X 消化液	95 μ l
配好的蛋白酶K	10 μ l

2. 混匀并且在 55 $^{\circ}$ C 孵育 1-3 个小时。（如果有必要可以进行过夜消化， 过夜消化并不会增加产量和影响 DNA 的完整性）
3. 添加 700 μ l 基因组 DNA 裂解液到上述离心管中混匀， 并在涡旋仪上振荡， 在 10,000 x g 下离心 1 分钟分离不溶的沉淀。
4. 将上清转移至 2 号柱中， 2 号柱套在一个收集管里， 在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
5. 将 2 号柱套在一个新的收集管里。
6. 添加 200 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2 号柱中， 在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
无需倒掉收集管中的废液， 即可直接进行下一步。

7. 添加 400 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2 号柱中，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
8. 将 2 号柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 \geq 50 μ l 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好，如果是 25mg 的组织可以添加 200 μ l），室温下放置 2-5 分钟，10,000 x g 离心 30 秒来洗脱基因组 DNA。

全血，生物体液等样品

以下步骤是针对从 100 μ l 全血中提取基因组 DNA 而设计的。血液样品可以是新鲜的或者冻存的，兼容 EDTA, 柠檬酸，肝素等抗凝剂。也可以提取其他生物体液或小于 5 \times 10⁶ 的细胞悬液。

1. 对于 100 μ l 全血，如果不足 100 μ l 则用水补齐。按照以下溶液配比添加到一个离心管中。

2X 消化液	95 μ l
配好的蛋白酶K	5 μ l

2. 混匀并且在 55 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。
3. 添加 700 μ l 基因组 DNA 裂解液到上述离心管中混匀，并在涡旋仪上振荡。
4. 将上述混合物转移至 2 号柱中，2 号柱套在一个收集管里，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
5. 将 2 号柱套在一个新的收集管里。
6. 添加 200 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2 号柱中，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
无需倒掉收集管中的废液，即可直接进行下一步。
7. 添加 400 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2 号柱中，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
8. 将 2 号柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 \geq 50 μ l 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好，一般选择 100-200 μ l），室温下放置 2-5 分钟，10,000 x g 离心 30 秒来洗脱基因组 DNA。

单细胞层

以下步骤是针对对 5 \times 10⁶ 以内的细胞单层而设计的。虽然细胞类型和培养环境不同，但此操作步骤兼容高密度和低密度的生长细胞。

1. 用胰蛋白酶消化或者从培养板等容器中刮下贴壁细胞。在 500 x g 下离心 5 分钟细胞悬液，去除上清液，用 1ml 的 PBS 重悬细胞沉淀并将细胞悬液移至一个离心管中。在 500 x g 下离心 5 分钟细胞悬液。去除上清液，用以下配比溶液重悬细胞沉淀。

H ₂ O	95μl
2X 消化液	95μl
配好的蛋白酶K	5μl

- 混匀并且在 55℃ 孵育 20 分钟。
- 添加 700μl 基因组 DNA 裂解液到上述离心管中混匀，并在涡旋仪上振荡。在 10,000 x g 下离心 1 分钟分离不溶解的细胞沉淀。
- 将上一步的上清转移至 2 号柱中，2 号柱套在一个收集管里，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
- 将 2 号柱套在一个新的收集管里。
- 添加 200μl 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2 号柱中，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
无需倒掉收集管中的废液，即可直接进行下一步。
- 添加 400μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2 号柱中，在 10,000 x g 下离心 1 分钟。
- 将 2 号柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 ≥ 50μl 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70℃ 水浴中预热效果更好，一般选择 200μl 如果细胞数达到 5x10⁶），室温下放置 2-5 分钟，10,000 x g 离心 30 秒来洗脱基因组 DNA。

以下表格为细胞量的参考，实际情况会根据不同的细胞类型而不同

培养容器	孔或瓶的表面积	细胞数
96孔培养板	0.32-0.6 cm ²	4-5x10 ⁴
24孔培养板	2 cm ²	1-3x10 ⁵
12孔培养板	4 cm ²	4-5x10 ⁵
6孔培养板	9.5 cm ²	0.5-1x10 ⁶
T25培养瓶	25 cm ²	2-3x10 ⁶
T75培养瓶	75 cm ²	0.6-1x10 ⁷
T175培养瓶	175 cm ²	2-3x10 ⁷

参考附录:

头发，毛发等相关样品

需要用到新鲜制备的 DTT(未提供)进行溶液的配制，替换针对固体组织操作步骤中的第一步，配置比例如下

H ₂ O	90μl
2X 消化液	90μl
DTT(1M)	10μl
配好的蛋白酶K	10μl

之后的操作步骤同固体组织操作。

石蜡包埋组织（FFPE）样品

在采用固体组织操作步骤之前组织首先需要脱蜡。脱蜡步骤如下

1. 尽可能多的去除（切掉）石蜡部分。
2. 将样品移至 1.5ml 离心管中，添加 750 μ l 的二甲苯（未提供）。
3. 短暂涡旋振荡后在室温下放置 1 小时，期间可使用摇床轻摇。
4. 在 10,000 x g 下离心 1 分钟，从样品中去除二甲苯。

重复 2-4 步

针对步骤 5-8，每一步的步骤都是添加洗涤液，短暂涡旋，在摇床上轻摇孵育 5 分钟，然后在 10,000 x g 下离心 1 分钟，去除洗涤液。

5. 用 1ml（100%）乙醇洗涤 2 次。
6. 用 1ml（95%）乙醇洗涤 2 次。
7. 用 1ml（75%）乙醇洗涤 2 次。
8. 用 1ml 双蒸水洗涤 1 次。
9. 从样品中去除尽可能多的双蒸水。
10. 使用样品进行提取或保存在-80 $^{\circ}$ C