简石生物
JIANSHI BIOTECH

操作手册

血液/细胞基因组 DNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TD324-50 (50 次反应)

TD324-200 (200 次反应)

Highlights

- 可从全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁，等样品里提取到高纯度的基因组 DNA。
- 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等敏感的分子生物学实验。

Ver.1.1.2

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	200 次
蛋白酶 K 及其保存液	-20℃	1 管	4 管
液体与细胞消化液（红色）	室温	12 ml	45 ml
基因组 DNA 结合液	室温	25 ml	85 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	30 ml	2 x 50 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	50 ml	200 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	10 ml	50 ml
2L 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。

环境温度低时基因组固体组织消化液或者基因组 DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37℃水浴几分钟帮助重新溶解使用。

特性:

- **样品种类:** 全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁等样品，保存在保护剂里的样品等。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。

  不推荐使用此试剂盒提取小 DNA 或者游离 DNA(可使用 TD476 产品)

- **基因组 DNA 大小:** 一般可回收到大于 50 kb 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 $Abs_{260/280} \geq 1.8$ $Abs_{260/230} \geq 2.0$。

- **基因组 DNA 产量:** 针对哺乳动物一般 100μl 全血中回收到 3μg 以上的基因组 DNA。

- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴（55℃）。微型离心机，涡旋仪。

样品来源:

液体样品

可从≤200μl 的全血，有核血，血块黄层，唾液，痰，精子，乳汁等样品里提取到总 DNA. 见附录

- 对于保存在 DNA/RNA 保护剂里的液体样品见附录。
- 有核血液样品，比如禽类血液，见附录。
- 对于单层细胞和口腔细胞的制备和收集参看附录。
- 对于从血清血浆中提取病毒 DNA,按照生物液体和细胞的操作流程就可以。对于游离 DNA 的提取，推荐使用游离 DNA 提取试剂盒（TD476）
- 对于提取尿液中细胞的 DNA, 在 3,000 x g 离心力下离心 15 分钟富集细胞，在提取之前去除上清，然后按照生物液体及细胞操作步骤操作。

哺乳动物或昆虫细胞培养物：

可从≤5x10^6细胞内像 HeLa 细胞, HEK-293 细胞, Drosophila 等样品里提取到总 DNA.

- 在处理细胞沉淀之前需要去除培养基。（大约在 500 x g 离心力下离心 2 分钟，取决于细胞类型和体积，然后去除上清）
- 对于哺乳动物细胞，蛋白酶 K 的消化时间在 55℃下可以减少到 5 分钟。
- 对于单层细胞和口腔细胞的制备和收集参看附录。

试剂制备:

在操作之前，需添加1060μl蛋白酶K保存液到每管蛋白酶K（20mg）中。蛋白酶K溶液的浓度为20mg/ml,混匀后，需要放到-20℃长期保存。

提取步骤:

使用基因组DNA洗脱液或其他等渗溶液（如PBS）来重悬培养的细胞沉淀。

（ ≤1 x 10^6 细胞使用 100 μl 基因组DNA洗脱液　　10^6-5 x 10^6 细胞数使用200 μl基因组DNA洗脱液 ）

55℃下的蛋白酶K过夜消化不会影响DNA的完整性。

生物液体和细胞
1. 添加最多200μl的样品到一个离心管中并且添加： 200μl 液体与细胞消化液（红色） 20μl 蛋白酶K 注意：如果样品不足200μl则需要按照比例调整液体与细胞消化液（红色），蛋白酶K及其基因组DNA结合液的用量。 2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后再55℃下孵育10分钟。 3. 混匀1倍体积的基因组DNA结合液到消化的样品中，混匀或者涡旋振荡10-15秒。 例如：添加420μl的基因组DNA结合液到420μl消化的样品中。

4. 将上清转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。
5. 将 2L 柱套在一个新的收集管里，添加 400μl 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
6. 添加 700μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。
8. 将 2L 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，如果是 25mg 的组织可以添加 200μl），室温下放置 2-5 分钟，全速离心 1 分钟来洗脱基因组 DNA。

附录A：

单细胞层样品提取

以下步骤是针对从 $5x10^6$ 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。

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， 之后按照生物液体及细胞的操作步骤进行操作。

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	$4\text{-}5x10^4$
24孔培养板	2 cm^2	$1\text{-}3x10^5$
12孔培养板	4 cm^2	$4\text{-}5x10^5$
6孔培养板	9.5 cm^2	$0.5\text{-}1x10^6$
T25培养瓶	25 cm^2	$2\text{-}3x10^6$
T75培养瓶	75 cm^2	$0.6\text{-}1x10^7$
T175培养瓶	175 cm^2	$2\text{-}3x10^7$

口腔脱落细胞及其拭子

提取口腔细胞可以通过漱口或者口腔拭子等方式

A. 漱口提取方法：用 10-20ml 盐溶液或者漱口水剧烈的漱口 30 秒。漱的越剧烈，获得的细胞会越多。将盐溶液吐到一个 50ml 的离心管中，在 1,500RPM 的转速下离心 5 分钟。去除上清，但不要影响细胞沉淀。之后按照生物液体及细胞的操作步骤进行操作。

B. 口腔拭子提取方法：在收集细胞之前用清水漱口。用口腔拭子刷脸颊内侧 15 秒（约 20 下），确保覆盖了脸颊内侧的所有区域。将拭子放在一个干净的离心管内用 200μl 液体与细胞消化液（红色）与 200μl 基因组 DNA 洗脱液的混合液清洗拭子。添加 20μl 的蛋白酶 K 混匀，然后在 55℃下孵育 10 分钟。然后从生物液体及细胞操作步骤的第 3 步进行操作。

附录B：

保存在 DNA/RNA 保护剂中的样品

DNA/RNA 保护剂可以在常温下稳定 DNA 和 RNA，方便样品的运输，无需冰箱或者冷链运输，并且有效裂解细胞灭活样品中的病毒。相关产品信息可与我公司联系。（TR110 或 TR120）

生物液体及细胞培养物

1. 添加 20μl 的蛋白酶 K 到 400μl 含有样品的保护剂中。
2. 混匀或者涡旋 10-15 秒在室温下孵育 20 分钟。
3. 然后从生物液体及细胞操作步骤的第 3 步进行操作。

附录C：

有核血液样品

1. 添加 10μl 的有核血液样品到以下混合液中：

液体与细胞消化液（红色）	200μl
蛋白酶 K	20μl
基因组 DNA 洗脱液（或者 TE）	200μl

2. 用吸头上下吹打混匀。在 55℃下孵育 20 分钟。
3. 添加 1 倍体积的基因组 DNA 结合液到消化的样品中，用吸头上下吹打混匀或者涡旋。在进行下述操作前，确保样品完全匀浆。

   注意：用移液器上下吹打混匀确保样品完全匀浆是有必要的。涡旋振荡可辅助增强效果。
4. 将混合液转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。
5. 将 2L 柱套在一个新的收集管里，添加 400μl 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
6. 添加 700μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在≥12,000 x g 离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。

8. 将 2L 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），室温下放置 2-5 分钟，全速离心 1 分钟来洗脱基因组 DNA。