

操作手册

血液/细胞基因组 DNA 提取试剂盒（磁珠法）

Catalog No. TD324-M (96 次反应)

Highlights

- 可从细胞，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、高通量测序等敏感分子生物学实验。

产品组成:

试剂盒组成	保存	96 次
蛋白酶 K 及保存液	-20°C	20mg x2
液体与细胞消化液 II	室温	50ml
磁珠结合液	室温	150 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	50 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	200 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	16 ml
磁珠	室温	6 ml

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°C 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。获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接应用 PCR，高通量测序等各种分子生物学实验。
- **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 $Abs_{260/230} \geq 1.8$ 。

- **基因组 DNA 产量:** 每 50 μ l 磁珠最多可结合 10 μ g 基因组 DNA。

试剂制备:

在操作之前，需添加1060 μ l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 $^{\circ}$ C长期保存。

提取步骤:

裂解环节:

生物液体和细胞

1. 添加 $\leq 200\mu$ l的样品到一个2ml的96孔板里，并且添加：
400 μ l 液体与细胞消化液II
20 μ l 蛋白酶K
2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后在55 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。
3. 添加600 μ l的磁珠结合液到上清中，用枪头混匀或者放在振荡器上振荡10分钟。

纯化环节:

以下步骤的混匀步骤即可以用移液器上下吹打也可以使用专业的震动摇床（rpm1200）。

4. 将混匀的磁珠添加 50 μ l 到 96 孔的样品孔中。混匀 10 分钟。
5. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。
6. 添加 900 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。
7. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。
8. 添加 900 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。

9. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。
10. 添加 900 μ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。
11. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。
12. 将 96 孔板移到一个加热模块上（55 $^{\circ}$ C）直到磁珠变干（大概 10 分钟），如果没有加热模块，可以在室温下放置 20-30 分钟自然晾干。
13. 添加 100 μ l 的基因组 DNA 洗脱液到每个孔中并且重悬磁珠，混匀磁珠 10 分钟，然后将 96 孔板移到一个磁力架上，放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。
14. 将上清（包含基因组 DNA）转到一个干净的 96 孔洗脱板内。

自动化设置：

1. 添加60ml磁珠结合液到一个96孔试剂槽内。
2. 添加50ml基因组DNA洗涤液1到一个96孔试剂槽内。
3. 添加200ml基因组DNA洗涤液2到一个96孔试剂槽内。
4. 添加16ml基因组DNA洗脱液到一个96孔试剂槽内。
5. 涡旋振荡磁珠30秒，然后添加6ml磁珠到一个96孔试剂槽内。

自动化操作步骤：

1. 在实验开始前先放置以下组件到自动化仪器合适的区域
 - a. 放置6板300 μ l标准吸头到自动化仪器内
 - b. 放置5板1000 μ l大体积吸头到自动化仪器内
 - c. 放置1板50 μ l小体积吸头到自动化仪器内
 - d. 放置1个磁力架和1个96孔PCR板到自动化仪器内
 - e. 放置含有样品的96孔板（block）到自动化仪器内（裂解步骤参见前面的操作步骤）
 - f. 放置2个96孔空的试剂槽来装废弃物。

2. 根据前面裂解的操作步骤来消化样品。
3. 从对应的试剂槽中吸取 600 μ l 的磁珠结合液到 96 孔板 (block) 中含有消化的样品孔内。
4. 上下移液混匀 (400 μ l 15 个循环)
5. 移液混匀磁珠 (50 μ l 10 个循环), 吸取 50 μ l 的磁珠。
6. 将 50 μ l 的磁珠移置 96 孔板 (block) 孔内。
7. 用 1000 μ l 的吸头移液混匀裂解物 (600 μ l 25 个循环)
8. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 3 分钟。
9. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
10. 使用慢速移液模式 (流速 \leq 50 μ l/s) 移除 1240 μ l 的上清。
11. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
12. 吸取 400 μ l 基因组 DNA 洗涤液 1。
13. 将 400 μ l 基因组 DNA 洗涤液 1 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (200 μ l 25 个循环)
14. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
15. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
16. 使用慢速移液模式 (流速 \leq 50 μ l/s) 移除 400 μ l 的上清。
17. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
18. 吸取 900 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2。
19. 将 900 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (400 μ l 25 个循环)
20. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
21. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
22. 使用慢速移液模式 (流速 \leq 50 μ l/s) 移除 900 μ l 的上清。
23. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
24. 吸取 900 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2。
25. 将 900 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (400 μ l 25 个循环)
26. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
27. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
28. 使用慢速移液模式 (流速 \leq 50 μ l/s) 移除 900 μ l 的上清。

29. 将 96 孔板移到一个加热模块上（55℃）直到磁珠变干（大概 10 分钟），如果没有加热模块，可以在室温下放置 20-30 分钟自然晾干。
30. 吸取 100μl 的基因组 DNA 洗脱液。
31. 添加 100μl 的基因组 DNA 洗脱液到每个孔中并且重悬磁珠，混匀磁珠 10 分钟，然后将 96 孔板移到一个磁力架上，放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。
32. 将 96 孔板（block）移到一个震荡设备上，RPM 800 下震荡 3 分钟。
33. 将 96 孔板（block）移到 96 孔磁力架上，放置 2 分钟。
34. 从 96 孔板（block）的孔中吸取 90μl 的基因组 DNA 洗脱液。
35. 将 90μl 的基因组 DNA 洗脱液（含有洗脱下来的基因组 DNA）移到 96 孔洗脱板中。

附录A：

单细胞层样品提取

以下步骤是针对从 5×10^6 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 $500 \times g$ 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 $500 \times g$ 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	4-5x10 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

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 200 μ l 液体与细胞消化液（红色）与 200 μ l 基因组 DNA 洗脱液的混合液清洗拭子。添加 20 μ l 的蛋白酶 K 混匀，然后在 55 $^{\circ}$ C 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：

有核血液样品

1. 添加 5 μ l 的有核血液样品到以下混合液中：

液体与细胞消化液	50 μ l
蛋白酶 K	5 μ l
基因组 DNA 洗脱液（或者 TE）	45 μ

2. 用吸头上下吹打混匀。在 55 $^{\circ}$ C 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. 从 DNA 纯化步骤开始继续下面的操作。