

操作手册

血液/细胞基因组 DNA 中量提取试剂盒

Catalog No. TD327-25 (25 次反应)

Highlights

- 可从 3ml 以内全血，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	25 次
蛋白酶 K 及保存液	-20℃	3x20mg
液体与细胞消化液（红色）	室温	2x45ml
基因组 DNA 裂解液	室温	150 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	250 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	200 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	10 ml
5E 柱套装	室温	25 个
收集管（2ml）	室温	50 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 100 μ l 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℃）。微型离心机，涡旋仪。

样品来源:

液体样品

可从 $\leq 3\text{ml}$ 以内的全血，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 $3,000 \times g$ 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 $\leq 3 \times 10^7$ 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 $500 \times g$ 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°C 下可以减少到 30 分钟。
- 对于单层细胞和口腔细胞的制备和收集参看附录。
- 对于保存在 DNA/RNA 保护剂中的样品。参看附录。

试剂制备:

在操作之前，需添加 $1060\mu\text{l}$ 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°C 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。

（ $< 1 \times 10^6$ 细胞使用 $500 \mu\text{l}$ 基因组 DNA 洗脱液 $1-3 \times 10^7$ 细胞数使用 $1,000 \mu\text{l}$ 基因组 DNA 洗脱液 ）

55°C 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3ml的样品到一个50ml离心管（不提供）中并且添加：

3ml 液体与细胞消化液（红色）

100μl 蛋白酶K

注意：如果样品不足3ml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裂解液的用量(参考表1)。

2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后再55℃下孵育

40分钟（样品量≤1ml） 2小时（样品量≤3ml）。

3. 混匀1倍体积的基因组DNA裂解液到消化的样品中（无需考虑蛋白酶K的体积），混匀或者涡旋振荡10-15秒。

例如：添加6ml的基因组DNA裂解液到6ml消化的样品中。

样品体积	500μl	1ml	2 ml	3 ml
液体与细胞消化液（红色）	500μl	1ml	2 ml	3 ml
蛋白酶 K	20μl	30μl	70μl	100μl
混匀并且在 55℃下孵育 30 分钟 40 分钟（样品量≤1ml） 2 小时（样品量≤3ml）				
基因组 DNA 裂解液	1 ml	2 ml	4 ml	6 ml

表 1

DNA 纯化步骤（兼容负压和离心两种方式）

<u>离心操作步骤</u>	<u>负压操作步骤</u>
<ol style="list-style-type: none">1. 确认 5E 柱套装（连接 15ml 套筒） 连接紧密后放置在一个 50ml 离心管里，倒入上一步的混合液，拧紧盖子。2. 在 1, 000 x g 离心力下离心 5 分钟。倒掉滤出液。3. 添加 9ml 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 5E 柱中，在 1, 000 x g 离心力下离心 5 分钟。倒掉滤出液。4. 添加 7ml 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 5E 柱中，在 1, 000 x g 离心力下离心 5 分钟。倒掉滤出液。	<ol style="list-style-type: none">1. 确认5E柱套装（连接15ml套筒）连接紧密后放置在真空多连器上，倒入上一步的混合液到与5E柱连接的15ml套筒中。2. 打开真空源，压力设置在$\geq 500\text{mm Hg}$.让混合物完全通过5E柱。3. 关闭真空源，添加9ml基因组DNA洗涤液1到5E柱套装中，打开真空源让液体完全通过柱子。4. 关闭真空源，添加7ml基因组DNA洗涤液2到5E柱套装中，打开真空源让液体完全通过柱子。

5. 去掉 **15ml 套筒**,将 **5E 柱**套在一个收集管内。在 **12, 000 x g** 离心力下空转 **1 分钟**去除残留液体。
6. 将 **5E 柱**套在一个新的收集管内，添加 **200 μ l 基因组 DNA 洗涤液 2**，在 **12, 000 x g** 离心力下离心 **1 分钟**，倒掉滤出液。
7. 将 **5E 柱**套在一个干净的 **1.5ml 离心管**内，添加 **200 μ l 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，洗脱效果更好），室温放置 **5 分钟**，在 $\geq 10,000 \text{ x g}$ 条件下离心 **1 分钟**来洗脱 **DNA**。

附录A：

单细胞层样品提取

以下步骤是针对从 **5x10⁷** 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	4-5x10 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 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 150 μ l 的有核血液样品到以下混合液中：

液体与细胞消化液（红色）	3 ml
蛋白酶 K	100 μ l
基因组 DNA 洗脱液（或者 TE）	3 ml

2. 用吸头上下吹打混匀。在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1-3 小时。
3. 添加 1 倍体积的基因组 DNA 裂解液到消化的样品中，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。