

# 操作手册

## 通用基因组 DNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TD468-50 (50 次反应)  
TD468-200 (200 次反应)

### Highlights

- 可从固体组织，生物体液，细胞，头发等复杂来源的样品中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	50 次	200 次
蛋白酶 K 及保存液	-20℃	20 mg	4 x20 mg
液体与细胞消化液（红色）	室温	12 ml	45 ml
固体组织消化液（蓝色）	室温	6 ml	20 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:** 固体组织，全血，细胞，毛发，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:** 针对哺乳动物组织可从每 mg 的心脏，脑组织中提取到 1-3 $\mu$ g DNA。每 mg 的肝，肾，肺组

织中提取到 3-5  $\mu\text{g}$  DNA。100 $\mu\text{l}$  全血中回收到 3 $\mu\text{g}$  以上的基因组 DNA。

- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴（55 $^{\circ}\text{C}$ ）。微型离心机，涡旋仪。

## **样品来源:**

### **液体样品:**

可从 $\leq 200\mu\text{l}$ 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. 见第 8 页。

- 对于保存在 DNA/RNA 保护剂里的液体样品见第 6 页。
- 有核血液样品，比如禽类血液，见第 6 页。
- 全血，唾液及保存在 Guthrie, FTA<sup>®</sup>上或其他保存纸（卡）上的细胞。见第 8 页。
- 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 $\leq 5 \times 10^6$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 下可以减少到 5 分钟。（见第 4 页）
- 对于单层细胞和口腔细胞的制备和收集参看第 5 页。
- 对于保存在 DNA/RNA 保护剂中的样品。参看第 6 页。

### **固体样品:**

可从 $\leq 25\text{mg}$ 尾巴，耳朵，器官活检（脑，肝，心脏，肾，肌肉，胃，膀胱，肠）等样品里提取到总 DNA。

- 可采用 55 $^{\circ}\text{C}$ 过夜蛋白酶 K 消化步骤。参看第 4 页第 2 步。
- 针对保存在 DNA/RNA 保护剂中的固体组织。参看第 6 页。

- 针对头发，毛发等组织。参看第 7 页。

### 试剂制备:

使用前需要添加1060μl保存液到20mg蛋白酶K里，蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml，混合之后需要放到-20℃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<sup>6</sup> 细胞使用 100 μl 基因组DNA洗脱液      10<sup>6</sup>-5 x 10<sup>6</sup> 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	固体组织
<p>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</p> <p>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。</p> <p>2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后再55℃下孵育10分钟。</p> <p>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。</p> <p>例如：添加420μl的基因组DNA结合液到420μl消化的样品中。</p>	<p>1. 添加≤25mg的组织到一个离心管里，并且添加： 95μl 水 95μl 固体组织消化液（蓝色） 10μl 蛋白酶K</p> <p>2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后再55℃下孵育1-3个小时或者直到组织溶解，进行下一步之前混匀。</p> <p>注意：如果消化后的样品中仍然有不溶解的组织，需要在≥ 12,000 x g 的离心力下离心1分钟，然后将上清转移到一个干净的离心管中进行下面的操作。</p> <p>3. 混匀2倍体积的基因组DNA结合液到上清中，混匀或者涡旋振荡10-15秒。</p> <p>例如：添加400μl的基因组DNA结合液到200μl上清中。</p>

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 700 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  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 $\geq 50\mu$ 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 $\mu$ l），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  $5 \times 10^6$  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 $\text{cm}^2$	$4-5 \times 10^4$
24孔培养板	2 $\text{cm}^2$	$1-3 \times 10^5$
12孔培养板	4 $\text{cm}^2$	$4-5 \times 10^5$
6孔培养板	9.5 $\text{cm}^2$	$0.5-1 \times 10^6$
T25培养瓶	25 $\text{cm}^2$	$2-3 \times 10^6$
T75培养瓶	75 $\text{cm}^2$	$0.6-1 \times 10^7$
T175培养瓶	175 $\text{cm}^2$	$2-3 \times 10^7$

### **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 $\mu$ l 液体与细胞消化液（红色）与 200 $\mu$ l 基因组 DNA 洗脱液的混合液清洗拭子。添加 20 $\mu$ 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：**

### **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 20 $\mu$ l 的蛋白酶 K 到 400 $\mu$ l 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。

#### 固体组织

1. 添加 150 $\mu$ l 的固体组织消化液（蓝色）和 10 $\mu$ l 蛋白酶 K 到每 300 $\mu$ l 含有样品的保护剂中。
2. 混匀或者涡旋 10-15 秒并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1-3 小时。

注意：55 $^{\circ}$ C 下过夜操作也是可以的，并且可以增强消化的效果和 DNA 的回收量。

3. 添加 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 10-15 秒。
4. 从主操作步骤的第 4 步开始进行接下来的操作。（第 4 页）

## **附录C：**

### **有核血液样品**

1. 添加 10 $\mu$ 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） 200 $\mu$ l

蛋白酶 K 20 $\mu$ l

基因组 DNA 洗脱液（或者 TE） 200 $\mu$ l

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 $\geq 12,000 \times g$ 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 400 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
6. 添加 700 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 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 $\geq 50\mu$ l 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。

## 附录D：

### 头发，毛发等相关样品

1. 需要用到新鲜制备的 DTT(未提供)进行溶液的配制，提取 $\leq 25\text{mg}$ 的样品配置比例如下：

H <sub>2</sub> O	90 $\mu$ l
固体组织消化液（蓝色）	90 $\mu$ l
DTT(1M)	10 $\mu$ l
蛋白酶K	10 $\mu$ l

2. 混匀或者涡旋 10-15 秒并在 55℃下孵育 1-3 小时。  
注意：55℃下过夜操作也是可以的，并且可以增强消化的效果和 DNA 的回收量。
3. 添加400 $\mu$ l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。在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心1分钟沉淀不溶的物质。
4. 将混合物（上清）转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在 $\geq 12,000 \times g$ 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 400 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离

心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。

6. 添加 700 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
7. 添加 200 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  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 $\geq 50\mu$ 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），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F：**

### **保存在保存卡（纸）上的样品**

将保存在 Guthrie, FTA 或其他类似的样品保存卡（纸）上的样品通过合适的穿孔器打孔，将裁切的介质添加到我公司的裂解管中（需额外购买），并且添加裂解液（需额外购买），简单涡旋匀浆后进行下述操作。

1. 添加保存卡（纸）到裂解管中，添加 400 $\mu$ l 裂解液。
2. 拧紧盖子放到合适的振荡器中最大速度下震荡。
3. 在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心裂解管 1 分钟。
4. 针对裂解管里的裂解物添加以下混合物：

固体组织消化液（蓝色）	360 $\mu$ l
蛋白酶K	40 $\mu$ l

5. 混匀并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 10-15 分钟。
6. 在 $\geq 10,000 \times g$  离心力下离心裂解管 1 分钟。将 400 $\mu$ l 上清移至一个干净的离心管里。
7. 添加 800 $\mu$ l 的基因组 DNA 结合液到离心管内混匀。
8. 转移 600 $\mu$ l 上述混合物到转移至 2L 柱中，2L 柱套在一个收集管里，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。
9. 倒掉收集管中的废液并且重复步骤 8。
10. 将 2L 柱套在一个新的收集管里，添加 400 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
11. 添加 700 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。倒掉收集管中的废液。
12. 添加 200 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗涤液 2 到 2L 柱中，在 $\geq 12,000 \times g$  离心力下离心 1 分钟。丢弃盛有滤出液的收集管。



13. 将 2L 柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 $\geq 50\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65-70°C 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。