

操作手册

血液/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒（磁珠法）

Catalog No. TB324-48 (48 次反应)

TB324-96 (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	48 次	96 次
蛋白酶 K	-20℃	20mg/ml	2x20mg/ml
磁珠结合液	室温	50 ml	100 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	30 ml	60 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	100 ml	200 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	5 ml	10 ml
磁珠	室温	1.5 ml	3 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℃ 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 20 μ l 磁珠最多可结合 10 μ g 基因组 DNA。

提取步骤:

裂解环节:

生物液体和细胞

1. 添加 $\leq 200\mu\text{l}$ 的样品到一个2ml的96孔板里，并且添加：

400 μl 磁珠结合液

20 μl 蛋白酶K

30 μl 混匀的磁珠

2. 在60°C下混匀或者振荡15-20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）。

3. 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。

4. 添加 500 μl 的基因组 DNA 洗涤液 1 到 96 孔样品孔中混匀 5 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 μl 的基因组 DNA 洗涤液 2 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 μl 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. 将 96 孔板在室温下放置 10 分钟直至磁珠晾干。

11. 添加 100 μl 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。

12. 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（推荐我公司 BrightBOT-32）操作步骤：

96 孔内试剂组成

	1、7 列	2、8 列	3、9 列	4、10 列	5、11 列	6、12 列
A	血液样品 200μl 蛋白酶 K 溶液 20μl 磁珠结合液 400μl	基因组 DNA 洗涤液 1 500μl	基因组 DNA 洗涤液 2 900μl	基因组 DNA 洗涤液 2 900μl	空	洗脱液 100μl
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

注意：第1、7列为样品添加孔

程序设置：

裂解加热：开	裂解温度：60℃		裂解终止：步骤三	
洗脱加热：开	洗脱温度：50℃		洗脱开始：步骤七	
	步骤一	步骤二	步骤三	步骤四
名称	Lysis	-	-	Wash I
孔位	1	-	-	2
等待时间	-	-	-	-
混合时间	1800s	-	-	120s
磁吸时间	60s	-	-	60s
容积	600μl	-	-	500μl
速度	快	-	-	快

裂解加热：开	裂解温度：60℃		裂解终止：步骤三	
洗脱加热：开	洗脱温度：50℃		洗脱开始：步骤七	
	步骤五	步骤六	步骤七	步骤八
名称	Wash II	Wash III	Elute	Move
孔位	3	4	6	4
等待时间	-	-	600s	-
混合时间	120s	120s	600s	120s
磁吸时间	60s	60s	60s	-
容积	900μl	900μl	100μl	900μl
速度	快	快	快	快

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	$4-5 \times 10^4$
24孔培养板	2 cm ²	$1-3 \times 10^5$
12孔培养板	4 cm ²	$4-5 \times 10^5$
6孔培养板	9.5 cm ²	$0.5-1 \times 10^6$
T25培养瓶	25 cm ²	$2-3 \times 10^6$
T75培养瓶	75 cm ²	$0.6-1 \times 10^7$
T175培养瓶	175 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 μ l 液体与细胞消化液 II 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。（例如采血管形式）

1. 添加 20 μ l 的蛋白酶 K 到 400 μ l 含有样品的保护剂中。
2. 混匀或者涡旋 10-15 秒在 55-60 $^{\circ}$ C 下孵育 20-30 分钟。
3. 然后添加等体积的异丙醇（~400 μ l）和混匀后的磁珠 30 μ l。混匀或者振荡 15-20 分钟。
4. 从主操作步骤第 3 步开始往下继续操作。