



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）

试剂盒内容

试剂盒组成	保存	20 次 (DP3301)	50 次 (DP3302)
缓冲液 A	室温	6ml	15ml
缓冲液 B	室温	6ml	15ml
缓冲液 C	室温	6ml	15ml
缓冲液 D	室温	10ml	25ml
洗脱缓冲液 EB	室温	6ml	15ml
Carrier	4℃	35ul	80ul
漂洗液 WB	室温	3ml	6ml
RNase-free ddH ₂ O	室温	0.4ml	1 ml
蛋白酶 K	-20℃	8mg 冻干粉	20mg 冻干粉
微量吸附柱	室温	20 个	50 个
收集管	室温	20 个	50 个

储存条件: 置于室温 (15-25℃) 干燥条件下, 可保存 12 个月, 更长时间的保存可置于 2-8℃。Carrier 配制成储存液后应置于 -20℃。

产品简介: 本试剂盒采用可以特异性结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲液系统, 样品裂解后, DNA 在高盐条件下与硅胶膜结合, 在低盐、高 pH 值时 DNA 从硅胶膜上洗脱下来。本试剂盒用于从小剂量的血液、干血点、血清/血浆、微量组织、漱口水、毛发、微切割组织等微量样品中提取基因组 DNA, 所得基因组 DNA 可直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 自备试剂: 无水乙醇: 1M DTT (提取毛囊毛发);
2. 样品使用量的确定: 微量样品 DNA 提取试剂盒技术指标 吸附柱最大容量 900ul, 最小洗脱体积 15ul, 抗凝全血 (哺乳动物) 最大量 100ul, 样品使用最大量 (动物组织) 最大量 10mg;
3. 若缓冲液 A 或缓冲液 B 中有沉淀, 可在 56℃ 水浴中重新溶解;
4. 所有的样品使用前请平衡到室温 (15-25℃);
5. 第一次使用试剂盒时, 请按照试剂瓶上的提示在漂洗液 WB 中添加无水乙醇;
6. 为了确保从微量样本中得到更多的 DNA, 试剂盒配备了 Carrier。由于 Carrier 本身是小核酸, 所以得到的基因组测定 OD₂₆₀ 值会比真实值偏大, 建议将得到的基因组直接用 PCR 进行检测;

一、从少量血中提取基因组 DNA

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 1-100ul 血液到 1.5ml 的离心管中;
2. 加缓冲液 A 到 100ul 终体积;
3. 加入 10ul 的蛋白酶 K 溶液; **注意: 如果需要去除 RNA, 可加入 5ul RNase A (100mg/ml) 溶液 (目录号: RT405-11), 振荡 15 秒, 室温放置 5 分钟。**
4. 加入 100ul 的缓冲液 C (如果最初所取血液样品体积为 1-10ul, 请加入 1ul Carrier 储存液), 轻轻颠倒混匀样品, 简短离心以去除管盖内壁的液滴。56℃温浴 10 分钟, 并不时轻摇样品; **注意: 加入缓冲液 C 时可能会产生白色沉淀, 一般 56℃放置时会消失, 不会影响后续实验。如溶液未变清亮, 说明细胞裂解不彻底, 可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。**
5. 加入 50ul 异丙醇, 轻轻颠倒混匀样品, 室温放置 3 分钟。简短离心以去除管盖内壁的液滴;
6. 将上一步所得溶液都加到一个吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
7. 向吸附柱中加入 500ul 缓冲液 D, 12000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
8. 向吸附柱中加入 500ul 漂洗液 WB (**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**), 12000rpm 离心 45 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 15-50ul 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2-5 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟, 将溶液收集到离心管中; **注意: 洗脱缓冲液体积不应少于 15ul, 体积过小影响回收效率。**

为增加基因组 DNA 的得率, 可将离心得到的溶液再次加入吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保存在-20℃, 以防 DNA 降解。

二、从干血点中提取基因组 DNA

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取三片 3 x 3mm 的样品到 1.5ml 的离心管中;
2. 加入 180ul 的缓冲液 A;
3. 加入 20ul 的蛋白酶 K 溶液，轻轻颠倒混匀。56℃ 孵育 1 小时，期间每 10 分钟涡旋 10 秒;
4. 加入 200ul 的缓冲液 C 和 1ul Carrier 储存液, 轻轻颠倒混匀样品，70℃ 孵育 10 分钟，期间每 3 分钟涡旋 10 秒，孵育结束后简短离心以去除管盖内壁的液滴；**注意：加入缓冲液 C 时可能会产生白色沉淀，一般 70℃ 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。**
5. 加入 100ul 异丙醇，轻轻颠倒混匀样品，室温放置 5 分钟。简短离心以去除管盖内壁的液滴;
6. 将上一步所得溶液都加到一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中;
7. 向吸附柱中加入 500ul 缓冲液 D，12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中;
8. 向吸附柱中加入 500ul 漂洗液 WB（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），12000rpm 离心 45 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中;
9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 15-50ul 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2-5 分钟，12000rpm 离心 2 分钟，将溶液收集到离心管中；**注意：洗脱缓冲液体积不应少于 15ul，体积过小影响回收效率。**

为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱中，室温放置 2 分钟，12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

三、从血清/血浆中提取循环核酸/游离核酸

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 200 μ l 液体 (血清、血浆等), 放入 1.5ml 离心管。
对如果液体起始量小于 200 μ l, 则用缓冲液A补足到 200 μ l。如果起始量介于 200 μ l-300 μ l 之间, 则后续操作需要按照比例增加试剂用量。
2. 加入 200 μ l 缓冲液C, 振荡 15 秒, **充分混匀**, 再加入 20 μ l 蛋白酶K (20mg/ml) 溶液, **颠倒轻摇充分混匀**, 72 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 溶液应清亮。
3. 冷却至室温, 加入 100 μ l 异丙醇, **剧烈颠倒轻摇, 充分混匀**, 此时可能会出现絮状沉淀。
上述各操作步骤中适当力度充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量。
4. 将上一步所得溶液和可能的絮状沉淀都加入一个吸附柱中, (吸附柱放入收集管中) 10,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液。
5. 加入 500 μ l 缓冲液D, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液。
6. 加入 500 μ l 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
7. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, **在吸附膜的中间部位加 15-50 μ l 洗脱缓冲液 EB**(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热), 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 15 μ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。
8. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

四、从漱口水中提取基因组 DNA

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 在 50ml 无菌管中添加 10-20ml 漱口水样品，1800g 离心 5 分钟，将上清小心倒掉；
2. 向沉淀中添加 200ul 缓冲液 A 重悬，将全部悬液转移至 1.5ml 离心管中；
3. 加入 20ul 的蛋白酶 K 溶液，涡旋 10 秒混匀，56℃ 孵育 60 分钟，期间每 15 分钟涡旋混匀数次；
4. 加入 200ul 的缓冲液 C 和 1ul Carrier，充分颠倒混匀，70℃ 孵育 10 分钟，期间每 3 分钟涡旋 10 秒，此时溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的液滴；**注意：加入缓冲液 C 时可能会产生白色沉淀，一般 70℃ 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。**
5. 加入 100ul 异丙醇，充分颠倒混匀，简短离心以去除管盖内壁的液滴；
6. 将上一步所得溶液和絮状沉淀加入一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
7. 向吸附柱中加入 500ul 缓冲液 D，12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
8. 向吸附柱中加入 500ul 漂洗液 WB（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），12000rpm 离心 45 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 15-50ul 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2-5 分钟，12000rpm 离心 2 分钟，将溶液收集到离心管中；**注意：洗脱缓冲液体积不应少于 15ul，体积过小影响回收效率。**

为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱中，室温放置 2 分钟，12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

五、从毛囊中提取基因组 DNA

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

请提前准备 1M DTT 溶液。

1. 材料处理: 含毛囊的毛发: 在 1.5ml 离心管中加入 250ul 缓冲液 A, 20ul 蛋白酶 K, 20ul 1M DTT, 混匀。从毛发根部毛囊处取 1cm 长的一段, 与上述溶液涡旋混匀 10 秒;
2. 在 56℃ 孵育直到样本充分降解消化。需要时间至少 60 分钟, 期间每隔 20 分钟涡旋 10 秒混匀或者置于水浴振荡仪中消化。简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体; **注意: 裂解时间根据样本不同有所差异, 一般毛发需要 1 小时; 过夜消化也可, 且过夜消化对整个实验没有太大影响。羽茎样本不会完全消化, 对于未消化完全的羽茎样本, 可以直接离心, 取上清液进行后续实验。**
3. 加入 300ul 的缓冲液 C 和 1ul Carrier, 充分混匀;
4. 56℃ 孵育 10 分钟, 期间每 3 分钟涡旋 10 秒;
5. 加入 300ul 无水乙醇, 充分涡旋混匀, 简短离心以去除管盖内壁的液滴;
6. 将上一步所得溶液和絮状沉淀分两次加入一个吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 12000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
7. 向吸附柱中加入 500ul 缓冲液 D, 12000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
8. 向吸附柱中加入 500ul 漂洗液 WB (**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**), 12000rpm 离心 45 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中;
9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 15-50ul 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2-5 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟, 将溶液收集到离心管中; **注意: 洗脱缓冲液体积不应少于 15ul, 体积过小影响回收效率。**

为增加基因组 DNA 的得率, 可将离心得到的溶液再次加入吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保存在 -20℃, 以防 DNA 降解。

六、从微量组织中提取基因组 DNA

操作步骤:

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取少于 10mg 组织细粉转入装有 100 μ l 缓冲液 B 的 1.5ml 离心管中, 用大口径枪头吹打混匀。
2. 加入 10 μ l 的蛋白酶 K(20mg/ml), **剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
3. 将裂解物放置在 55°C 水浴 1 小时或者直到组织消化完全, 期间轻柔的振荡几次帮助裂解。
4. 加入 100 μ l 缓冲液 C, **剧烈颠倒轻摇充分混匀**, 70°C 放置 10 分钟。
5. 冷却后加入 50 μ l 异丙醇, **剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
6. 用 1ml 的枪头吸取部分上述混合物, 可能有不溶组织物进入并堵住枪头, 可将枪头在吸水纸上轻蹭去除不溶物, 如果吸上来的混合物少则可以将枪头和不溶物一起弃去, 该步骤是为了去除不溶物, 以免下面不溶物堵塞离心柱。
7. 将上一步剩余混合物加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 10,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液。
8. 加入 500 μ l 缓冲液 D, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。
10. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 15-40 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热), 室温放置 3-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
11. DNA 可以存放在 2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20°C。

七、从微量切割样品中提取基因组 DNA（包括福尔马林固定的微切割样品）

操作步骤：

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 加入 15ul 缓冲液 A 到 0.2ml 离心管中，放入微切割样品；
2. 加入 10ul 蛋白酶 K，涡旋混匀 10 秒；
3. 56℃ 孵育 3 小时使样本充分降解消化。若福尔马林样品需要孵育 16 小时，期间隔段时间需要涡旋混匀或者置于水浴振荡仪中消化。简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体；
4. 加入 25ul 的缓冲液 A，混匀。再加入 50ul 缓冲液 C 和 1ul Carrier，涡旋混匀 10 秒，简短离心以去除管盖内壁的液滴；
5. 加入 50ul 乙醇（96-100%），如果室温超过 25℃，请将乙醇置冰上预冷，轻轻颠倒混匀样品，室温放置 5 分钟。简短离心以去除管盖内壁的液滴；
6. 将上一步所得溶液全部转入一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
7. 向吸附柱中加入 500ul 缓冲液 D，12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
8. 向吸附柱中加入 500ul 漂洗液 WB（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中；
9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 15-50ul 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2-5 分钟，12000rpm 离心 2 分钟，将溶液收集到离心管中；**注意：洗脱缓冲液体积不应少于 15ul，体积过小影响回收效率。**

为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱中，室温放置 2 分钟，12000rpm 离心 2 分钟。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

北京百泰克生物技术有限公司 BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781

传 真：010-62951781

网 址：www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com