



植物DNA试剂盒说明书

Plant DNA Kit Handbook



杭州新景生物试剂开发有限公司

HANGZHOU SIMGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

地址：浙江省杭州市西湖科技经济园金蓬街366号1幢东4F

技术支持：400-0099-857 邮箱：technical@simgen.cn

电话：0571-87381295 0571-87381297

传真：0571-87381297 邮编：310030

网址：www.simgen.cn



适用样本类型：植物、种子、真菌、酵母、细菌、粪便、昆虫、骨骼，
动物组织、血液、唾液、培养细胞等

可从多至200 mg样本中提取总DNA

无需RNase A及蛋白酶K消化步骤

无需额外添加乙醇或结合液再过柱纯化

优选的纯化柱可吸附纯化高达50 μ g基因组DNA

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
用户需自备的试剂与物品	1
技术支持	1
质量保证	1
注意事项	1
产品介绍	2
操作步骤分析与说明	2
起始样本用量与DNA的参考产量	2
样本裂解	2
选择性沉淀蛋白及细胞碎片	2
柱纯化技术	3
DNA的回收效率与纯度	3
使用前准备	4
操作流程图示	4
操作步骤	5
从植物组织、丝状真菌、蘑菇中分离纯化DNA	5
从种子或块茎中分离纯化DNA	6
从酵母中分离纯化DNA	7
从粪便中分离纯化DNA	8
从全血或动物细胞中分离纯化DNA	9
从细菌中分离纯化DNA	10
从动物组织中分离纯化DNA	11
从节肢动物（昆虫等）、骨骼组织中分离纯化DNA	12
常见问题分析	13

产品组成

植物DNA试剂盒 Cat. No.	5次样品 3201005	50次制备 3201050	250次制备 3201250
核酸纯化柱	5个	50个	250个
2 ml离心管	5个	50个	250个
Buffer PL	3 ml	30 ml	150 ml
Buffer K	2 ml	20 ml	100 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml	60 ml
Buffer WB (浓缩液)	1.5 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml	60 ml
说明书	1份	1份	1份

产品储存与有效期

产品如果储存于室温（15~25°C），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8°C，可延长产品的有效期至两年以上。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇，可能需要液氮与研钵
2. 1.5ml 离心管与移液器吸头
3. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器、水浴锅或干式恒温器
6. 可能需要自备 TE 缓冲液（10mM Tris-HCl, 1mMEDTA, pH 8.0, Simgen Cat. No. 9006500）
7. 可能需要 RNase A 贮存液(Simgen Cat. No. 8001001)
8. 可能需要蛋白酶 K 贮存液(Simgen Cat. No. 8000224)
9. 可能需要研磨棒（Simgen Cat. No. D-050）
10. 可能需要溶菌酶（Simgen Cat. No. 8009500）

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，
e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

质量保证

杭州新景生物试剂开发有限公司保证所提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求。根据我们以往的经验，用户使用的样本差异是导致不能满足要求的最主要原因，如果需要从一些罕见的样本中分离纯化 DNA，请务必与我们的技术支持沟通后再进行实验操作。

注意事项

Buffer PL、Buffer K和Buffer WA含刺激性化合物，操作时请戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗帮助。

产品介绍

本产品适用于从无法彻底溶解的生物样本中提取DNA，因而最适合从植物、真菌、粪便、细菌、节肢动物等样本中分离纯化DNA，同时本产品也可用于从全血及动物组织中分离纯化DNA。本产品特别设计的缓冲溶液及配套的纯化柱，仅高效吸附大片段基因组DNA，因而大多数情况下无需额外添加RNA酶消化即可除去RNA。操作步骤非常简单快捷，仅需溶解、离心沉淀样本中的不溶物后，即可将含有DNA的上清液加入核酸纯化柱进行DNA吸附，纯化柱中的DNA再经Buffer WA和Buffer WB洗涤后，用Buffer TE洗脱，即可获得适用于各种分子生物学实验的高纯度基因组DNA。

操作步骤分析与说明

1. 起始样本用量与DNA的参考产量

样本	推荐用量	DNA产量 (μg)
植物组织、丝状真菌、蘑菇	50~150 mg新鲜组织或者10~30 mg干燥组织	3~25
植物衰老的叶片、种子或块茎 (含大量淀粉)	100~200 mg	1~15
酵母	5~10 ml酵母培养物	1~5
粪便	30~50 mg	5~15
节肢动物	50~100 mg	1~10
骨骼	50~100 mg	5~50
动物组织	50~100 mg	10~30
细菌	3~5ml 细菌培养物	10~30
哺乳动物抗凝全血、唾液、骨髓	300 μl	3~25
禽类、两栖类、鱼类等红细胞有核生物的全血	5~10 μl	15~25
培养细胞	5~10×10 ⁶ 个细胞	5~25

2. 样本裂解

有坚固的细胞壁的样本，比如植物组织、真菌或酵母，需要用研钵将样本研磨成匀浆状；如果植物组织纤维含量高，还必须补加液氮研磨，使样本充分破碎；细菌细胞壁可用溶菌酶溶解；蛋白含量高的样本，还应添加蛋白酶K消化蛋白，其目的是为了促使样本中的DNA与蛋白质彻底解离开来。

3. 选择性沉淀蛋白及细胞碎片

加入Buffer K后将会使溶液中大部分的蛋白质沉淀下来，为了使基因组DNA维持在溶液中的溶解状态，避免蛋白沉淀带走基因组DNA，此步骤需要剧烈振荡（漩涡振荡30秒）。沉淀的蛋白经高速离心后聚集到1.5ml离心管底部，与基因组DNA分离开来。

4. 柱纯化技术

1) DNA 结合

将离心获取的含有 DNA 的上清液倒入纯化柱中短时离心数秒，即可使 DNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，PCR 抑制剂或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。特别设计的缓冲体系及优选的硅胶膜仅高效吸附大片段基因组 DNA，除 RNA 含量非常高的样本（酵母、昆虫等）外，大多数样本均无需额外添加 RNA 酶消化即可除去 RNA。

2) 洗涤

纯化柱上通常会残留少量蛋白，Buffer WA 能有效地洗去这些残留的蛋白。

Buffer WB 会洗去残留在膜上的 Buffer WA，确保纯净的 DNA 吸附在纯化柱上。

DNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可，因此对离心速度和离心时间并无严格的要求，可以选用离心机中的“short run”模式运行以节约操作时间。

3) 离心甩干

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟（如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，我们建议至少使用 12000-13000 rpm 离心 2 分钟。）的作用：

A. 使 Buffer WB 被充分地离心除去。

B. 在丢弃 Buffer WB 滤液的过程中，如果有滤液不慎沾染到纯化柱底部，也可被离心除去。

4) 洗脱 DNA

A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 Buffer TE（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0）洗脱 DNA，以便于 DNA 的长期稳定储存；也可以用去离子水洗脱 DNA，但是应确保去离子水的 pH 大于 7，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

B. 预热的 Buffer TE 或者去离子水能提高 DNA 的洗脱效率。

C. 将 Buffer TE 或者去离子水加入纯化柱后延长静置的时间（延长至 3-5 分钟）能提高 DNA 的洗脱效率。

D. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 Buffer TE 洗脱 DNA，无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇，过度干燥的纯化柱会不利于 DNA 的洗脱。

E. 洗脱的基因组 DNA 片段在 200bp-50kb 之间，主要的 DNA 片段集中在 30kb 左右。

F. 出于产品使用安全的考虑，如果离心机没有防泄漏的盖子，我们建议在洗脱 DNA 的时候将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以避免 1.5 ml 离心管管盖脱落。

5. DNA 的回收效率与纯度

不同种类的植物由于含水量差异极大，因而相同质量的样本获取的 DNA 差异也非常大。同一种植物的同一组织样本中应优选幼嫩的组织提取 DNA。如果样本中 DNA 的含量较低，可以考虑提高样本的使用量以增加 DNA 的回收量，但应注意样本的最大使用量不应超过推荐使用量的一倍。

本产品所配套的纯化柱硅胶膜孔径较大，针对 RNA 或小片段 DNA 吸附效率低，如果样本中 DNA 有降解的情况（比如石蜡组织、尸体等），不应选择本试剂盒。

DNA 的质量通常用测量 260 nm 处的光吸收值进行估算，换算方式为 1OD 光密度值相当于双链 DNA 浓度为 50 μ g/ μ l。DNA 的纯度通常用 A₂₆₀/A₂₈₀ 进行估算，纯净 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应该在 1.7-1.9 之间；DNA 的盐分残留度通常用 A₂₆₀/A₂₃₀ 进行估算，纯净 DNA 的 A₂₆₀/A₂₃₀ 比值应该在 1.8-2.5 之间。

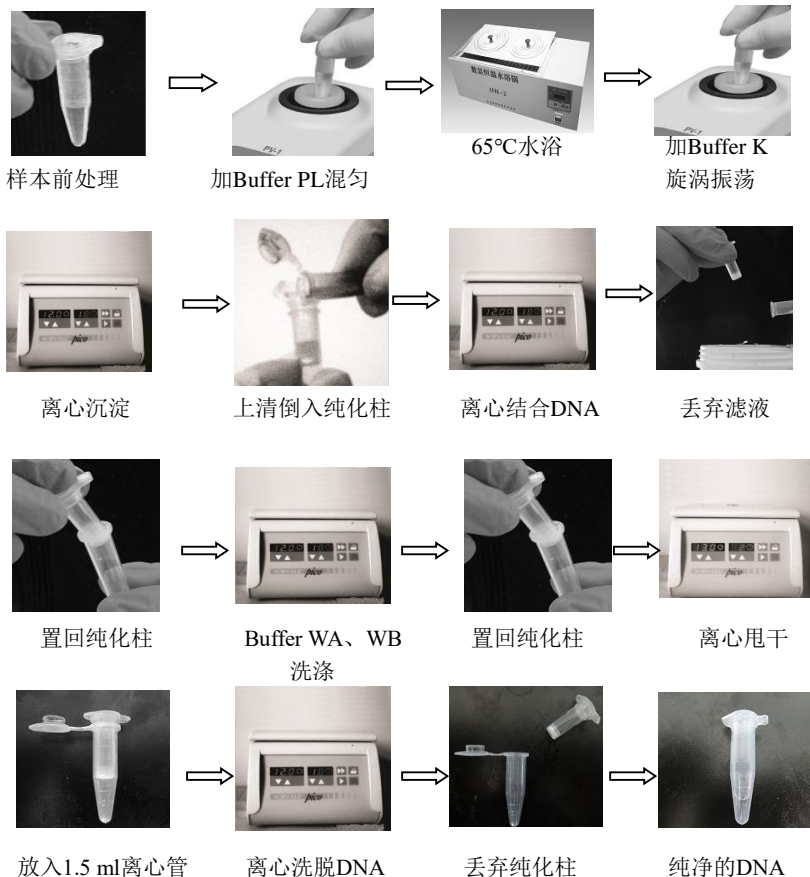
使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
- 2) 将水浴锅温度设置到 65°C，并将 Buffer PL 和 Buffer TE 温育至 65°C。
- 3) 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。



扫二维码观看操作视频

操作流程图示



从植物组织、丝状真菌、蘑菇中分离纯化 DNA

- 1. 加液氮浸没组织，先将约300~500 mg (100~200 mg干燥的组织) 样本研磨成细小颗粒状，待液氮蒸发后再将组织颗粒快速研磨至粉末状。用液氮预冷的1.5 ml 离心管称取50~100 mg (10~20 mg干燥的组织) 研磨成粉末状的组织。**
 - * 为了将组织研磨成尽可能细小的颗粒，同时也为了避免磨碎好的组织粉末因融化而难以称量，可采用多次补加液氮重复研磨的方式研磨样本。必须将植物组织研磨至粉末状（像面粉一样细腻），才能充分破坏植物细胞的细胞壁(特别是丝状真菌)，否则将严重影响最终DNA的回收效率。
 - * 对于纤维含量低的植物组织，可以直接称取100 mg样本放入研钵，加入100 μ l Buffer PL常温研磨至匀浆状，然后再补加400 μ l 65°C预热的Buffer PL研磨数次混匀，将所有匀浆液（包括产生的泡沫）转入一个洁净的1.5 ml离心管中，直接按步骤2的65°C水浴10分钟步骤进行操作。
- 2. 加入500 μ l 65°C预热的Buffer PL，旋涡振荡30秒混匀，65°C水浴10分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。**
- 3. 加入350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃15秒，旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。**
- 4. 将步骤 3 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。**
- 5. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。**
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。
 - * 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。
- 6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。**
 - * 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。
 - * 某些植物的色素可能会残留在纯化柱的滤膜上，出现上述情况可再增加一步无水乙醇的洗涤（加入600 μ l无水乙醇，12000 rpm 离心30秒）。
- 7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。**
 - * 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
- 8. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65°C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。**
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
- 9. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20°C备用。**

从种子或块茎中分离纯化 DNA

1. 称取100-200 mg样本放入研钵中，加入100 μ l TE缓冲液（Simgen Cat. No. 9006500，用户自备），常温研磨至匀浆状。

* 如果样本非常干燥，适当增加TE缓冲液。

* 如果种子或块茎的体积较大，切取含胚芽或有芽孢部分提取DNA。

2. 加入500 μ l 65°C预热的Buffer PL稀释研磨好的样本，全部转移到一个自备的1.5ml离心管中，65°C水浴10分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。

3. 加入350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃15秒，旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。

4. 将步骤 3 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

5. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。

* 某些植物的色素可能会残留在纯化柱的滤膜上，但不会溶解在Buffer TE中，并不影响所提取的DNA的纯度。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65°C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20°C备用。

从酵母中分离纯化 DNA

1. 收集过夜培养的酵母菌液5~10ml，弃尽上清。

* 如果用1.5 ml离心管收集酵母，可以按12000rpm离心30秒的条件多次离心富集菌体。

2. 加入200 μ l TE缓冲液 (Simgen Cat. No. 9006500, 用户自备), 勿弃吸头, 直接用吸头吹打菌体沉淀, 并将其吸出转入研钵中。倒入液氮浸没菌液 (菌液碰到液氮后会立即凝集成块), 用力研磨直至菌块呈粉末状。

3. 当研成粉末状的酵母开始融化时, 用吸头将匀浆物全部转入1.5 ml离心管中。

* 如果菌块未能研磨成粉末状, 则应补加液氮继续研磨, 否则将严重影响最终DNA的回收效率。

* 在没有液氮的条件下, 可采用直接研磨约15min左右充分破坏细胞壁, 在此过程中如果液体被蒸发掉, 补加适量TE缓冲液继续研磨, 然后吸取全部匀浆液转入1.5 ml离心管中, 按步骤4操作。

4. 加入2 μ l RNase A 贮存液 (Simgen Cat. No. 8001001, 用户自备), 65°C水浴5分钟。

5. 加入300 μ l Buffer PL 和20 μ l 蛋白酶K贮存液 (Simgen Cat. No. 8000224, 用户自备), 盖上管盖, 旋涡振荡30秒混匀, 65°C水浴20分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。

6. 加入350 μ l Buffer K, 盖上管盖, 用力摇晃15秒, 旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。

7. 将步骤6中的离心上清液倒入核酸纯化柱 (核酸纯化柱置于2ml 离心管中) 中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

8. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

9. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

10. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 盖上管盖, 14000 rpm 离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm, 则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

11. 弃2ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中, 在纯化柱中加入60~100 μ l 65°C预热的Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置2分钟, 12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。

12. 弃纯化柱, 洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验; 或者将DNA储存于-20°C备用。

从粪便中分离纯化 DNA

1. 用1.5 ml离心管收集30~50mg粪便，加入250 μ l TE缓冲液（Simgen Cat. No. 9006500，用户自备）旋涡振荡直至粪便颗粒全部悬浮。

* 如果粪便呈液态，则直接吸取50 μ l粪便；如果从小鼠粪便中提取DNA，可在加入250 μ l TE缓冲液后用研磨棒（Simgen Cat. No. D-050，用户自备）研碎粪便颗粒。

2. 加入250 μ l Buffer PL，用力摇晃混匀，95 $^{\circ}$ C水浴5分钟。

* 如果仅需要检测肠道细胞DNA或者粪便中的革兰氏阴性细菌的DNA，则仅需70 $^{\circ}$ C 水浴5分钟。

3. 加入 350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，旋涡振荡 30 秒。13000 rpm 离心 5 分钟。

4. 将步骤 3 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

5. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65 $^{\circ}$ C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

从全血或动物细胞中分离纯化 DNA

无核红细胞抗凝全血、唾液或骨髓样本请按步骤 1a 操作；

有核红细胞抗凝全血样本请按步骤 1b 操作；

动物培养细胞样本请按步骤 1c 操作。

1a. 加20 μ l 蛋白酶K 贮存液 (Simgen Cat. No. 8000224, 用户自备) 到1.5 ml 离心管管底, 再加入300 μ l 抗凝全血、唾液或骨髓。进入步骤2 操作。

* 如果抗凝全血的体积小于300 μ l, 请补加PBS溶液使血液终体积调整到300 μ l。

1b. 加20 μ l 蛋白酶K 贮存液 (Simgen Cat. No. 8000224, 用户自备) 到1.5 ml 离心管管底, 加入290 μ l TE 缓冲液 (Simgen Cat. No. 9006500, 用户自备), 再加入5-10 μ l 有核红细胞抗凝全血。进入步骤2 操作。

1c. 用1.5 ml 离心管收集5~10 \times 10⁶ 个细胞, 加入290 μ l TE 缓冲液 (Simgen Cat. No. 9006500, 用户自备) 悬浮细胞, 再加入20 μ l 蛋白酶K 贮存液 (Simgen Cat. No. 8000224, 用户自备)。进入步骤2 操作。

2. 加入200 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的Buffer PL, 旋涡振荡30秒混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴10分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。

3. 加入350 μ l Buffer K, 盖上管盖, 用力摇晃15秒, 旋涡振荡30秒。13000 rpm 离心5分钟。

4. 将步骤 3 中的离心上清液倒入核酸纯化柱 (核酸纯化柱置于2ml 离心管中) 中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

5. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

6. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB, 盖上管盖, 12000 rpm 离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

7. 弃2ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中, 盖上管盖, 14000 rpm 离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm, 则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃2ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中, 在纯化柱中加入100~200 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置2分钟, 12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱, 洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验; 或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

从细菌中分离纯化 DNA

革兰氏阴性菌请按步骤 1a 操作；

革兰氏阳性菌请按步骤 1b 操作。

1a. 用1.5 ml离心管收集3~5 ml革兰氏阴性细菌培养物，加入200 μ l TE缓冲液 (Sigma Cat. No. 9006500, 用户自备)，旋涡振荡充分悬浮细菌。进入步骤2操作。

1b. 用1.5 ml离心管收集3~5 ml革兰氏阳性细菌培养物，加入100 μ l TE缓冲液 (Sigma Cat. No. 9006500, 用户自备)，旋涡振荡充分悬浮细菌。加入100 μ l溶菌酶溶液 (Sigma Cat. No. 8009500, 用户自备)，旋涡振荡约15秒混匀，37 $^{\circ}$ C水浴30分钟。进入步骤2操作。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如MRS培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入1 ml蒸馏水，旋涡振荡悬浮细菌后12000 rpm离心30秒，弃蒸馏水上清，再加入200 μ l TE缓冲液，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 溶菌酶溶液配制方法：按每1 ml去离子纯水加入100 mg溶菌酶的比例配制成100 mg/ml的溶菌酶溶液。

* 溶菌酶溶液冻融后会严重降低溶菌效率，请尽量使用新鲜配制的或冻融不超过一次的溶菌酶溶液。

2. 加入250 μ l 65 $^{\circ}$ C预热的Buffer PL，旋涡振荡30秒混匀，65 $^{\circ}$ C水浴10分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。

* 如果从新鲜培养好的细菌中提取DNA，可能会将部分细菌中的RNA一起分离纯化出来，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验。如果要彻底除去RNA，可在本步骤中补加2 μ l RNase A 贮存液 (Sigma Cat. No. 8001001, 用户自备)。

3. 加入350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃15秒，旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。

4. 将步骤 3 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

5. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65 $^{\circ}$ C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

从动物组织中分离纯化 DNA

1. 用手术刀切取50~100 mg人或动物组织（大鼠尾0.4-0.6 cm一段或小鼠尾0.4-0.6 cm两段），再用刀尖将组织剁成匀浆状，转移组织到一个1.5 ml离心管中。
 - * 必须将组织颗粒剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。
 - * 如果所提取的组织中含致密结缔组织较多，比如皮肤、肌腱、鼠尾等，应用手术刀刀尖将组织切成尽量小的碎屑，以缩短溶解时间。
2. 加入20 μ l蛋白酶K贮存液（Simgen Cat. No. 8000224，用户自备），再加入200 μ l 65 °C预热的TE缓冲液（Simgen Cat. No. 9006500，用户自备），旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。
3. 加入300 μ l 65°C预热的Buffer PL，旋涡振荡30秒混匀，65°C水浴30分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。
 - * 针对含致密结缔组织较多的样本，可采用65°C过夜水浴的方法，达到充分溶解组织，提高DNA回收量的目的。
4. 加入350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃15秒，旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。
5. 将步骤 4 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。
 - * 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。
7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
 - * 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。
8. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。
 - * 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
9. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65°C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
10. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20°C备用。

从节肢动物（昆虫等）、骨骼组织中分离纯化 DNA

1. 取300~500 mg（节肢动物包括外骨骼）组织放入研钵中，加入液氮研磨成细小颗粒状，待液氮蒸发后再将组织颗粒快速研磨至粉末状。用液氮预冷的1.5 ml 离心管称取50~100 mg研磨成粉末状的组织。
2. 加入200 μ l 65 °C预热的TE缓冲液（Simgen Cat. No. 9006500，用户自备），旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。
 - * 如果是从鲜活的节肢动物中提取DNA，此步骤应再加入2 μ l RNase A贮存液（Simgen Cat. No. 8001001，用户自备），盖上管盖，用力摇晃混匀，65°C水浴5分钟后再进入步骤3操作。
3. 加入20 μ l蛋白酶K贮存液（Simgen Cat. No. 8000224，用户自备）和300 μ l 65 °C预热的Buffer PL，旋涡振荡30秒混匀，65°C水浴10分钟。水浴期间每隔2~3分钟用力摇晃离心管数次以帮助DNA的释放。
4. 加入350 μ l Buffer K，盖上管盖，用力摇晃15秒，旋涡振荡30秒。13000 rpm离心5分钟。
5. 将步骤 4 中的离心上清液倒入核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2ml 离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
 - * 如果有脂类物质漂浮在上清顶部，请用移液器小心地转移上清到核酸纯化柱中，不带有漂浮物。
6. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。
 - * 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。
7. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。
 - * 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。
8. 弃2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，盖上管盖，14000 rpm 离心1分钟。
 - * 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
9. 弃2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 μ l 65°C预热的Buffer TE，盖上管盖，室温静置2分钟，12000 rpm 离心30秒。
 - * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
10. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20°C备用。

常见问题分析

1. 回收不到DNA或者DNA的回收效率低

可能的原因:

- 1) 样本中DNA含量低,水分或多糖衍生物含量高。可尝试加倍样本的使用量。注意每增加50 mg样本的用量,请相应减少50 μ l Buffer PL的用量。
- 2) 样本中酚或者粘多糖含量太高,沉淀物中带走了DNA。选择植物/真菌DNA试剂盒(Simgen Cat. No. 3200050)提取DNA。
- 3) 选用了衰老的植物叶片。衰老的叶片中DNA含量会严重降低,如果条件允许,尽量选择新鲜长出的植物叶片提取DNA。
- 4) 保存不当,导致样本中的DNA降解。对于含水量高的组织样本均应贮存于-20 $^{\circ}$ C,推荐贮存于-70 $^{\circ}$ C。
- 5) Buffer WA或Buffer WB中未加入无水乙醇。应按比例补加无水乙醇,如果是错误地加入了其他试剂,请向我公司技术部寻求帮助。
- 6) DNA的洗脱效率差。参考第3页柱纯化技术中的第4点“洗脱DNA“内容优化DNA的洗脱方案。

2. A₂₆₀/A₂₈₀ 比值过高

纯化得到的DNA中RNA含量过高。如果是从鲜活的样本中提取DNA,可在加入Buffer PL时同步加入2 μ l RNase A贮存液(Simgen Cat. No. 8001001,用户自备),以减少RNA的残留。

3. A₂₆₀/A₂₃₀ 比值不正常

- 1) 纯净的DNA的A₂₆₀/A₂₃₀比值应该在1.8-2.5之间,如果A₂₆₀/A₂₃₀严重偏离该范围,请注意观察纯化柱上的硅胶膜是否残留有植物色素。如果色素残留较为严重,请在Buffer WB洗涤纯化柱后再增加1~2次无水乙醇洗涤(在纯化柱中加入600 μ l无水乙醇,12000 rpm 离心30秒)。
- 2) 错误地使用了Buffer WA和Buffer WB的洗涤顺序。确保按正确的顺序洗涤纯化柱。

4. DNA后续实验效果不佳

- 1) 盐分残留过多。注意Buffer WA和Buffer WB的洗涤顺序,确保按正确的顺序洗涤纯化柱。
- 2) 乙醇残留过多。注意高速空离步骤不可省略,并且空离后的核酸纯化柱应小心取出,避免倒置,以免使2 ml离心管管底的残留滤液接触到核酸纯化柱。
- 3) 使用了过多的DNA用作PCR模板。通常50 μ l PCR反应体系中加入100-500 ng DNA作为模板(单拷贝基因)比较适宜。

5. DNA被剪切成小片段,电泳时出现严重拖尾现象

- 1) 样本被反复冻融多次。尽量避免反复冻融样本,或者冷冻贮存前先将样本分割成小块后再冻存。
- 2) 样本太陈旧。陈旧的样本仅含断裂的DNA片段。