

动物组织 DNA 中量试剂盒说明书

产品组成

动物组织 DNA 中量试剂盒	25 次制备
Cat. No.	3103025
核酸纯化柱	25 套
蛋白酶 K 贮存液	1.2 ml×5
Buffer AT	60 ml
Buffer SL	60 ml
Buffer WA (浓缩液)	56 ml
Buffer WB (浓缩液)	78 ml
Buffer TE	60 ml
说明书	1 份

产品储存与有效期

1. 蛋白酶 K 贮存液可常温运输，收到后请置于 - 20°C 储存。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30°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。

技术支持

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

产品介绍

本产品适合从 ≤250 mg (脾脏 ≤100 mg) 新鲜的或者是冷冻贮藏的人或动物组织中分离纯化多至 500 μg 总 DNA (包括基因组 DNA、线粒体 DNA 及可能存在的病毒 DNA)。被溶解的动物组织经蛋白酶 K 消化后 DNA 将结合到纯化柱上，降解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 50 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式离心机 (可配离心 50 ml 离心管的转子)
5. 水浴锅、旋涡振荡器和恒温培养箱

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 56°C 和 70°C，将 Buffer AT 和 Buffer TE 温育至 56°C。
3. 将恒温培养箱设置到 56°C。
4. 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做好“乙醇已加”的标记。

操作步骤：

1. 用手术刀切取 ≤ 250 mg 人或动物组织（脾脏少于 100 mg），再用刀尖将组织剁成匀浆状，转移到一个 50 ml 离心管中。
 - * 必须将组织剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。
 - * 勿使用超过250 mg的组织，否则将超出蛋白酶K的消化能力，导致纯化柱堵塞等问题。
 - * 如果所提取的组织中含结缔组织较多，比如皮肤、肌腱、鼠尾等，则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。
 - * 上述步骤也可用组织匀浆器进行匀浆，然后将经Buffer AT悬浮的组织匀浆液转移到一个50 ml离心管中。如果溶液体积不足2 ml，则应补加Buffer AT使匀浆液总体积至2 ml，再加入200 μ l蛋白酶K贮存液，盖上管盖，旋涡振荡数秒混匀，进入步骤3的操作。
2. 加入 200 μ l 蛋白酶 K 贮存液，再加入 1.8 ml 56°C预热的 Buffer AT，盖上管盖，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。
3. 56°C水浴 30 分钟，期间旋涡振荡数次帮助组织溶解。
 - * 如果30分钟水浴后发现仍有不可溶解的组织颗粒存在，可延长水浴时间（比如过夜消化）直至组织全部溶解。注意：如果过夜消化应盖紧管盖，以免长时间水浴的过程中液体大量蒸发。
 - * 对于皮肤、肌腱等难以溶解的组织，可将离心管放入恒温混匀器或摇床中56°C，900 rpm温育直至组织彻底溶解。
 - * 如果从非常新鲜的组织中提取DNA，可能会同时获得部分RNA，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验。若需去除RNA，请在本步骤结束后添加10 μ l RNase A (50 mg/ml)（试剂盒不提供，可单独订购，Simgen Cat. No. 8001001），旋涡振荡30秒混匀，室温静置2分钟后再进入步骤4的操作。
4. 加入 2 ml Buffer SL，盖上管盖，旋涡振荡约 15 秒混匀。将离心管置于 70°C 水浴 15 分钟。
 - * 如果此步骤结束后发现有不可溶解的颗粒存在（比如昆虫的外骨骼，毛发等），则应于12000 rpm离心1分钟，吸取上清液转移到另一个50 ml离心管中，弃沉淀物，保留上清进入步骤5的操作。
5. 加入 2 ml 无水乙醇，盖紧管盖，温和地翻转 4-6 次混合均匀。
6. 将混合液倒入到核酸纯化柱中，盖上管盖， ≥ 4500 rpm 离心 5 分钟。
 - * 注意管盖不要拧紧，应留有间隙，以免影响上清液的滤过。
7. 弃 50 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 5 ml Buffer WA，盖上管盖， ≥ 4500 rpm 离心 2 分钟。
 - * 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。
8. 弃 50 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 10 ml Buffer WB，盖上管盖， ≥ 4500 rpm 离心 2 分钟。
 - * 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。
9. 弃 50 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中，最高速离心 5 分钟。
 - * 此步骤是为了弃尽残留的乙醇，请勿省略。
10. 弃 50 ml 离心管，将核酸纯化柱置于另一个洁净的 50 ml 离心管（用户自备）中，放入 56°C恒温培养箱中静置 10 分钟。
11. 在核酸纯化柱中央加 1~2 ml 56°C温育的 Buffer TE，盖上管盖，56°C恒温培养箱中静置 5 分钟， ≥ 4500 rpm 离心 2 分钟。
 - * Buffer TE的用量必须大于1 ml，否则将导致纯化柱上的膜不能被润透，从而降低DNA的回收效率。
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。