

For research use only

Version Number: 2.1

Animal Tissue DNA Isolation Kit

For genomic DNA purification from cultured cells and animal tissues

试剂盒组成	DE-05011
	50 T
Buffer L1	20 mL
Buffer L2 *	20 mL
Buffer PW *	25 mL
Buffer WB	25 mL
Buffer EB	10 mL
Foregene Protease	1 mL
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

*: Buffer L2、Buffer PW 中含有具刺激性的离液盐，操作时请注意戴上手套和进行相关防护措施。

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的 DNA-Only Column、全新的 Foregene Protease 以及独特的缓冲液体系，可以在 30-50 分钟内从各种培养细胞、动物组织中提取到高质量的基因组 DNA。

离心柱中采用的 DNA-Only 硅胶膜为本公司特有新型材料，高效、专一吸附 DNA，可最大限度的去除 RNA、杂质蛋白、离子及细胞中其他有机化合物。提取的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。组织块只需 10-50 mg 即可得到 5-80 µg 基因组 DNA。

储存条件

- ❖ 本试剂盒在常温(15-25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需保存更长时间可置于 2-8°C。
- ❖ Foregene Protease 溶液具有独特配方，常温保存长期(3 个月)具有活性；在 4°C 保存，其活性和稳定性会更好，因此建议将其置于 4°C 保存，切记不能置于 -20°C 保存。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也会下降。
- ❖ 使用前，仔细检查 Buffer L1、Buffer L2 和 Buffer PW 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB 在使用前添加 60 mL 无水乙醇(DE-05011)。
- ❖ 洗脱体积：Buffer EB 不应少于 100 µL，否则会影响 DNA 产量。
- ❖ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ❖ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

A. 培养细胞基因组 DNA 操作

使用前请先在 Buffer WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 用细胞刮刀将细胞($\leq 5 \times 10^6$)从培养皿中刮下，收集于 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 1,000 ×g 离心 5 min，弃除细胞培养基(可用移液器将培养基吸除干净，以免影响后续操作)，加入 **400 µL Buffer L1**，重悬细胞。
3. 向混合液中加入 **20 µL Foregene Protease**，涡旋混匀，放置于 **65°C** 金属浴或水浴中 **10-20 min**，其间涡旋混匀一次(或用手指用力弹击离心管底部数次)以帮助细胞酶解。
注意：涡旋时间不宜太长，每次 2 sec 即可，长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。
4. 酶解完成后，加入 **400 µL Buffer L2**，此时会有上下分层出现，颠倒混匀至分层消失，置于 **65°C** 金属浴或水浴中 **10 min**。
5. 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **5-10 min**。
6. 将上清液用移液器转移到离心柱(DNA-Only Column)中，不要吸取到沉淀。
注意：如果吸取的上清液中还有微小沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
7. 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **1 min**，弃掉收集管中的废液。
8. 向离心柱中加入 **500 µL Buffer PW**，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **1 min**，弃掉收集管中的废液。
9. 向离心柱中加入 **700 µL Buffer WB**，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **1 min**，弃掉收集管中的废液。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 将离心柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 ×g) 空离 **2 min**，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。
12. 将离心柱移至新的 1.5 mL 离心管中，向膜中央悬空滴加 **100 µL** 已于 **65°C** 预热的 **Buffer EB** (切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 5min，12,000 rpm (~13,400

×g) 离心 **1 min**。再次向膜中央悬空滴加 **100 μL** 已预热的 **Buffer EB**, 12,000 rpm(~13,400 ×g) 离心 **1 min**。将两次收集的洗脱液合并。

注意: 如果希望提高 DNA 的浓度, 可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min。

B. 动物组织基因组 DNA 操作

使用前请先在 **Buffer WB** 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

- 称取 **10-50 mg** 新鲜或冻存的动物组织, 尽量剪碎, 以便于后续酶解反应。
注意: 肝脏中酶含量较高, 可以将其剪碎置于预冷的研钵中, 加入液氮将其研碎, 迅速转移至干净的离心管中。
- 向离心管中加入 **400 μL Buffer L1**, **20 μL Foregene Protease**, 涡旋混匀, 放置于 **65°C** 金属浴或水浴中约 **30 min**, 其间每间隔 10 min 涡旋混匀一次(或用手指用力弹击离心管底部数次)以帮助动物组织酶解。
注意: 涡旋时间不宜太长, 每次 2 sec 即可, 长时间的剧烈涡旋会导致基因组 DNA 断裂成小片段。
- 酶解完成后, 加入 **400 μL Buffer L2**, 此时会有上下分层出现, 颠倒混匀至分层消失, 置于 **65°C** 金属浴或水浴中 **10 min**。
- 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 **5-10 min**。
- 将上清液用移液器转移到离心柱(DNA-Only Column)中, 注意尽量不要吸到沉淀。
注意: 如果吸取的上清液中还有微小沉淀, 可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清, 加入离心柱中。
- 12,000 rpm(~13,400 ×g) 离心 **1 min**, 弃掉收集管中的废液。
- 向离心柱中加入 **500 μL Buffer PW**, 12,000 rpm(~13,400 ×g)离心 **1 min**, 弃掉收集管中的废液。
- 向离心柱中加入 **700 μL Buffer WB**, 12,000 rpm(~13,400 ×g)离心 **1 min**, 弃掉收集管中的废液。
- 重复步骤 8 一次。
- 将离心柱放回收集管中, 12,000 rpm(~13,400 ×g)空离 **2 min**, 弃掉离心柱中残余的 Buffer WB。
- 将离心柱移至新的 1.5 mL 离心管中, 向膜中央悬空滴加 **100 μL** 已于 **65°C** 预热的 **Buffer EB**(切勿将洗脱液添加到压圈上, 否则会损失较大体积的洗脱液), 室温放置 5 min, 12,000 rpm(~13,400 ×g) 离心 **1 min**。再次向膜中央悬空滴加 **100 μL** 已预热的 **Buffer EB**, 12,000 rpm(~13,400 ×g) 离心 **1 min**。将两次收集的洗脱液合并。
注意: 如果希望提高 DNA 的浓度, 可将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min。

组织: 10-50mg

细胞: 1-5×10⁶



样本酶解 {
400μl Buffer L1: 提供酶解环境
20μl Foregene Protease: 65°C
400μl Buffer L2: 65°C; 10min
细胞: 10-20min
组织: ~30min

离心: 13,400 ×g ; 5-10min (去沉淀, 上清液过柱)

吸附: 上柱吸附基因组DNA (13,400 ×g ; 1min)

洗涤1: 500μl Buffer PW (13,400 ×g; 1min)
去蛋白、去RNA

洗涤2: 700μl Buffer WB 两次 (13,400 ×g; 1min)
脱盐

离心: 空管离心 (13,400 ×g; 2min)
去残留乙醇

洗脱: 100-200μl Buffer EB或ddH₂O (13,400 ×g; 1min)
(添加Buffer EB后室温5min, 再离心以增加洗脱效率)