

UE 基因组 DNA 小量制备试剂盒

本试剂盒采用独特的裂解和蛋白酶 K 消化技术，结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到纯化基因组 DNA 的目的。每次制备可获得多至 20 μg 的基因组 DNA。用于 PCR、Southern 印迹分析、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-MS -GDNA-10	UE-MN-MS -GDNA-50	UE-MN-MS -GDNA-250
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps
Miniprep column	10	50	250
2 ml Microfuge tube	20	100	500
1.5 ml Microfuge tube	10	50	250
RNase A	12 μl	60 μl	300 μl
Buffer C-L	2 ml	9 ml	45 ml
Proteinase K	4 mg	18 mg	90 mg
PK Buffer	260 μl	1.2 ml	6 ml
Buffer P-D	5 ml	25 ml	125 ml
Buffer W1	6 ml	30 ml	145 ml
Buffer W2 concentrate	5 ml	24 ml	120 ml
Eluent	3 ml	12 ml	60 ml
Protocol manual	1	1	1

Miniprep column: 小量制备管。室温密闭贮存。

RNase A: 50 mg/ml, 室温保存。

Buffer C-L: 裂解液, 室温密闭贮存。

Proteinase K: 冻干的蛋白酶 K 可室温贮存 6 个月, 长时间保存请置于 4°C; 溶解后, 在 2-8°C 可贮存 2 个月, 长时间保存请勿置于室温中。

Buffer PK: 蛋白酶 K 溶解液, 室温密闭贮存。

Buffer P-D: 蛋白去除液, 室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液, 室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前, 按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇, 混合均匀, 室温密闭贮存。可用 100%乙醇或 95%乙醇。

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 室温密闭贮存。

二、注意事项

Buffer C-L、Buffer P-D 和 Buffer W1 含刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

- 第一次使用时, 在 Buffer W2 concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇并混合均匀。
- 根据瓶上标签将蛋白酶 K 溶解于 Buffer PK 中, 请勿旋涡振荡。
- 准备 56°C 水浴。
- 使用前检查 Buffer C-L 是否有沉淀析出, 若出现沉淀, 请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解后再使用。
- 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 有利于基因组 DNA 的充分洗脱。

四、操作步骤

步骤 1-5 请根据不同的样品选择相应的操作, 匀浆、裂解和除蛋白质及其它杂质。

【从动物组织中提取基因组 DNA】

- 取 1-20 mg 动物或人组织, 移入冰水浴预冷的研钵中, 快速、用力研磨成匀浆。

*下列组织请加液氮研磨至粉末状后, 将研钵置于 56°C 水浴, 当粉末开始融化时继续研磨 1 min, 匀浆后加入 350 μl PBS 和 0.9 μl RNase A, 再进入步骤 3 的操作下。

- 富含 DNA 酶的胰脏, 脾脏, 胸腺, 淋巴等组织。
- 富含胶原蛋白的皮肤、肌腱等组织。

C. 富含角质蛋白的组织或坚硬的组织如骨骼等。

- 加入 350 μl Buffer PBS 和 0.9 μl RNase A 后温和地研磨 30 s。
- 收集 350 μl 研磨好的组织匀浆并转入 2 ml 离心管。如匀浆体积不足 350 μl, 补充 PBS 至 350 μl。
- 加入 150 μl Buffer C-L 和 20 μl Proteinase K。立即旋涡振荡 1 min 混合均匀。短暂离心后, 将离心管置 56°C 水浴 10 min。
*不要将 Proteinase K 直接加到 Buffer C-L 中。
- 加入 350 μl Buffer P-D, 旋涡振荡 30 s 混合均匀, 12,000×g 离心 10 min。

【从植物组织中提取基因组 DNA】

- 按下表称取适量的新鲜植物组织 (如选用的是冷冻干燥的组织, 则组织用量减半)。剪成小块放入研钵中; 加入液氮, 使组织冷冻完全后, 快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止组织融化, 研磨充分后将研钵放入 56°C 水浴至样品粉末刚开始融化。

*表 1 新鲜植物样品用量按下表收集

植物花或叶片	10-100	mg
植物茎	≤240	mg
植物根	≤240	mg
植物种子	≤240	mg

*样品研磨应充分, 否则严重影响基因组 DNA 的得率。

*如从培养的植物细胞中提取基因组 DNA, 收集 $2 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ 培养的植物细胞, 10,000×g 离心 1 min, 加入 150 μl PBS 充分悬浮细胞并转入研钵中, 加入液氮, 使组织冷冻完全后, 快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止组织融化, 研磨充分后将研钵放入 56°C 水浴至样品粉末刚开始融化。

- 加入 350 μl PBS 和 0.9 μl RNase A 贮存液, 用力碾磨 30 s。
*如新鲜植物叶超过 120 mg 或干植物叶超过 60 mg, 加入 700 μl PBS。按照步骤 2 完全操作后, 将匀浆样品分到两个 2 ml 离心管中, 然后按照步骤 4-5 平行操作两管, 第 6 步和接下来的步骤合并到一管操作, 以提高洗脱的 DNA 的浓度。
- 转移 350 μl 研磨好的匀浆至 2 ml 离心管中, 如匀浆体积不足 350 μl, 补充 PBS 至 350 μl。
- 加入 150 μl Buffer C-L 和 20 μl Proteinase K。立即旋涡振荡 1 min 混合均匀。短暂离心后, 将离心管置 56°C 水浴 10 min。
*不要将 Proteinase K 直接加到 Buffer C-L 中。
*富含纤维的根/茎等组织或富含淀粉、蛋白质的种子等样品, 可延长水浴时间至 30 min。
- 加入 350 μl Buffer P-D, 旋涡振荡 30 s 混合均匀, 12,000×g 离心 10 min。

【从培养细胞、淋巴细胞、骨髓、干血和骨头中提取基因组 DNA】

根据培养细胞的类型来操作, 若从植物细胞中提取基因组 DNA, 请按步骤 (从植物组织中提取基因组 DNA) 来匀浆。

A. 悬浮培养的细胞或新鲜分离的动物组织单细胞悬液

- 1A. 用 2 ml 离心管收集 $1 \times 10^3 - 2 \times 10^6$ 细胞悬浮液, 2,000×g 离心 5 min, 弃尽上清。
- 2A. 加入 350 μl 去离子水或 PBS 悬浮细胞。

B. 单个细胞培养或 96 孔板、24 孔板、12 孔板和 6 孔板细胞培养

- 1B. 尽可能的丢掉上清液, 加 350 μl PBS 到每孔中, 室温静置 1 min。
- 2B. 用吸头来回吸注几次, 转移 350 μl 匀浆至 2 ml 离心管, 如匀浆体积不足 350 μl, 补足 PBS 至 350 μl。

C. 淋巴细胞

- 1C. 加 350 μl PBS 到每孔中, 室温静置 1 min。

2C. 用吸头来回吸注几次，转移 350 μ l 匀浆至 2 ml 离心管，如匀浆体积不足 350 μ l，补足 PBS 至 350 μ l。

D. 骨髓

1D. 切除骨头的两端，用针头吸 350 μ l PBS 从骨头一端冲出骨髓。
2D. 用吸头来回吸注几次，转移 350 μ l 匀浆至 2 ml 离心管，如匀浆体积不足 350 μ l，补足 PBS 至 350 μ l。

E. 干血

1E. 加 350 μ l PBS 到每孔中，室温静置 1 min。
2E. 用吸头来回吸注几次，至干血完全溶解，如匀浆体积不足 350 μ l，补足 PBS 至 350 μ l。

F. 骨头

1F. 取 10-50 mg 骨头，移入冰水浴预冷的研钵中，快速、用力研磨成匀浆；加入 350 μ l PBS，用力碾磨 30 s。
2F. 用吸头来回吸注几次，转移 350 μ l 匀浆至 2 ml 离心管，如匀浆体积不足 350 μ l，补足 PBS 至 350 μ l。
3. 加入 0.8 μ l RNase A，漩涡振荡 15 s，室温静置 1 min。
4. 加入 150 μ l Buffer C-L 和 8 μ l Proteinase K。立即漩涡振荡 1 min 混合均匀。短暂离心后，将离心管置于 56°C 水浴 10 min。
**不要将 Proteinase K 直接加到 Buffer C-L 中。*
5. 加入 350 μ l Buffer P-D，漩涡振荡 30 s 混合均匀，12,000 \times g 离心 10 min。

【从酵母中提取基因组 DNA】

1. 收集 2×10^6 - 5×10^7 酵母细胞，10,000 \times g 离心 1 min。用 350 μ l PBS 悬浮酵母细胞并转移至研钵中，加入液氮，待样品被完全冷冻后，快速、用力研磨至粉末状。将研钵放入 56°C 水浴至样品粉末刚开始融化时进入下一步操作。
**当 OD₆₀₀ 为 1 时，酵母浓度为 3×10^7 细胞/ml。
*酵母细胞壁较为坚韧，应适当延长研磨时间和研磨次数以确保充分破碎酵母细胞壁。
研磨时应及时加入液氮，防止样品在研磨时融化。
2. 加入 1.2 μ l RNase A 贮存液，快速用力碾磨 30 s。
3. 转移 350 μ l 研磨好的匀浆至 2 ml 离心管中，如匀浆体积不足 350 μ l，补充 PBS 至 350 μ l。
4. 加入 150 μ l Buffer C-L 和 20 μ l Proteinase K。立即漩涡振荡 1 min 混合均匀。短暂离心后，将离心管置 56°C 水浴 10 min。
**不要将 Proteinase K 直接加到 Buffer C-L 中。*
5. 加入 350 μ l Buffer P-D，漩涡振荡 30 s 混合均匀，12,000 \times g 离心 10 min。

步骤 6-10，可选择负压法或离心法

A. 负压法

6A. 将 DNA 制备管插到负压装置的插口上，将步骤 5 的离心后的上清液移到制备管中，开启并调节负压装置至 -20-30 英寸汞柱。
7A. 保持负压，加入 500 μ l Buffer W1，吸尽管中液体。
8A. 保持负压，加入 700 μ l 已加入乙醇的 Buffer W2，吸尽管中液体；以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
**确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
*沿管壁加入 Buffer W2 有助于彻底冲洗附在管壁上的盐分。
两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐分被完全清除，消除对酶切反应的影响。

9A. 将 DNA 制备管放回 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。

B. 离心法

6B. 将 DNA 制备管置于 2 ml 离心管中，将步骤 5 的离心后上清液移至制备管中，12,000 \times g 离心 1 min。
7B. 弃滤液，将制备管置回到原来的 2 ml 离心管中，加入 500 μ l Buffer W1，12,000 \times g 离心 1 min。
8B. 弃滤液，将制备管置回到原来的 2 ml 离心管中，加入 700 μ l Buffer W2，12,000 \times g 离心 1 min，以同样的方法，用 700 μ l Buffer W2 再洗涤一次。
**确认 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
再次用 Buffer W2 冲洗能确保盐分被完全清除，消除对酶切反应的影响。
9B. 弃滤液，将制备管置回原来的 2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1 min。
10. 将 DNA 制备管置于另一洁净的 1.5 ml 离心管中，在制备管膜中央加 100-200 μ l Eluent 或去离子水，室温静置 1 min，12,000 \times g 离心 1 min 洗脱 DNA。
**将去离子水或 Eluent 加热至 65°C 将提高洗脱效率。*

五、流程图

