

Universal DNA Extraction Mini Kit B

通用型 DNA 小提试剂盒 B

本产品适合于从 1~20mg 动物组织和小于 5×10^6 培养细胞等样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

产品组份

产品编号	DNU333-01B	DNU333-02B	DNU333-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Extraction Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer TL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer MBL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2A	5 ml	20 ml	2 x 30 ml
RNase Solution	60 μ l	300 μ l	1.4 ml
Proteinase K	220 μ l	1.1 ml	5.5 ml
Buffer EB	1.5 ml	10 ml	60 ml

保存条件

本产品除 RNase Solution 外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer TL 可能会有沉淀形成，需 55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20~8 $^{\circ}$ C。

准备事项

- 水浴锅
- Buffer W1A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

A. 动物组织的消化裂解(1~20mg)

1. 把 1~20mg 组织剪成尽量小的碎片，转移至 1.5ml 离心管中。加入 220 μ l Buffer TL 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。55 $^{\circ}$ C 温浴 1~3 小时或过夜消化，期间颠倒混匀几次或振荡温浴。
2. 加入 5 μ l RNase Solution 至消化液中，涡旋混匀，室温放置 10 分钟。
RNA 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 RNA，需较长的消化时间。
3. 加入 250 μ l Buffer MBL 至消化液中，高速涡旋 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. (可选: 有未消化物质)13,000 x g 离心 3 分钟, 转移上清至新的 1.5ml 离心管中。按第 5 步进行操作。

B. 培养细胞的消化裂解(不超过 5×10^6)

1. 计算细胞数量。2,000 x g 离心 5 分钟收集细胞，小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 220 μ l Buffer TL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋 10 秒重悬细胞。55 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟。
3. 加入 5 μ l RNase Solution 至裂解液中，涡旋混匀 10 秒钟，室温放置 10 分钟。
4. 加入 250 μ l Buffer MBL 至细胞重悬液中，涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。按第 5 步进行操作。

C. 液体样品(拭子保存液样品、唾液、胸水等)

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 20 μ l Proteinase K。
2. 加入 250 μ l 唾液、抗凝血液等样品，涡旋 5 秒。
3. 加入 250 μ l Buffer MBL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. 按第 5 步进行操作。

D. 血片、干拭子样品

1. 转移拭子样品到 1.5ml 离心管中，加入 320 μ l Buffer TL 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。55 $^{\circ}$ C 振荡温浴 30 分钟，若无振荡温浴，期间颠倒混匀数次。
2. 13,000 \times g 离心 1 分钟，转移 250 μ l 上清液至新的离心管中。
3. 加入 250 μ l Buffer MBL，涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 振荡温浴 10 分钟。
4. 按第 5 步进行操作。

过柱纯化

5. 加入 250 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。
加入乙醇时有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。
6. 把 gDNA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移第五步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。
若柱子出现堵塞，14,000 x g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 μ l，分次过柱。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W1A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。
该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 μ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
柱子最小的洗脱体积是 30 μ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量。富含核酸样品如肝脏、脾脏、肺脏，用量不要超过 10mg。
- **样品消化不充分：**用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **样品裂解不充分：**样品与 Buffer MBL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer MBL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer MBL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 13,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分：**延长消化时间让样品充分消化，用玻璃匀浆器对样品进行匀浆。
- Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。