

Universal Genomic DNA Kit (Proteinase K)

通用型基因组 DNA 提取试剂盒（蛋白酶 K）

目录号：DNE29

试剂盒组成

Component	DNE29-01 (50 preps)	DNE29-02 (100 preps)
Buffer SL	15 ml	25 ml
Buffer VL	15 ml	25 ml
Buffer WB1	25 ml	50 ml
Buffer WB2(concentration)	13 ml	25 ml
Buffer EB	10 ml	20 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml	1 ml x 2
RNase A (25 mg/ml)	500 µl	1 ml
Spin Columns AC with Collection Tubes	50	100

保存方法

室温（15-30°C）保存。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒适合从血液、动物培养细胞、多种动物组织和培养细菌中提取基因组 DNA，纯化过程无需苯酚/氯仿等有机试剂。采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他杂质可流过膜，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

提取得率

样本材料	提取量	总 DNA 量
哺乳动物全血	100-400 μ l	3-10 μ g
禽类、两栖类全血	5-20 μ l	5-40 μ g
细胞培养液	10^6 - 10^7 cells	5-30 μ g
动物组织	30 mg	2-30 μ g
细菌培养液	10^6 - 10^8 cells	5-30 μ g
精液	100 μ l	2-5 μ g

自备试剂

无水乙醇；**1 M DTT 溶液**（提取精子 DNA 时须准备）；**溶菌酶缓冲液**（提取革兰氏阳性菌时须准备），配制方法：将溶菌酶溶解在 TE 缓冲液中（10 mM Tris-HCl，1 mM Na₂EDTA，PH8.0），使溶菌酶浓度为 20 mg/ml。

注意事项

1. 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下降。
2. 储存温度低时若缓冲液 SL 或 VL 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
3. 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，混匀后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

1. 材料处理

动物组织

- a) 动物组织 5-30 mg 剪成小碎块（或打碎成细胞悬液）放入 1.5 ml 离心管，加入 200 μ l Buffer SL 和 20 μ l Proteinase K（20 mg/ml），振荡混匀，56°C 水浴直至组织消化溶解，进行步骤 2。

注意：1）提取的组织不同，起始量也稍有不同，脾脏组织用量应少于 10 mg，鼠尾取 0.2-0.5 cm 的尾巴尖。2）不同组织裂解时间不同，通常 1-3 h 即可完成，每小时涡旋混匀样品 2-3 次（必要时可以消化过夜，不会影响后续操作）。

血液及培养细胞

a) **无核红细胞抗凝血（哺乳类动物）**：当血液体积 < 200 μ l 时，直接加入 Buffer SL 补足至 200 μ l；当体积为 0.2-1 ml 时，加入两倍体积红细胞裂解液 Buffer RCL（**试剂盒未提供，如有需要联系经销商索取**），颠倒混匀 10 次，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min，倒弃红色上清，留下管底细胞核沉淀（如果沉淀仍为红色，可重复裂解一次），加入 200 μ l Buffer SL，剧烈振荡充分裂解细胞核。

有核红细胞抗凝血（禽类、鸟类、两栖类等）：无需去除红细胞，直接取 5-10 μ l 抗凝血，加入 200 μ l Buffer SL。

贴壁培养细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5×10^6 个细胞），10,000 rpm (~11,200 $\times$ g) 离心 1 min，弃尽上清，留下细胞沉淀，加入 200 μ l Buffer SL，振荡至彻底悬浮；

b) 加入 20 μ l Proteinase K（20 mg/ml），涡旋振荡混匀**进行步骤 2。**

细菌基因组提取

a) 取 0.5-2 ml 细菌培养液（最多不超过 2×10^9 个细胞），10,000 rpm (~11,500 $\times$ g) 离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集细菌沉淀。

b) **革兰氏阴性菌**：向菌体沉淀中加入 **200 μ l Buffer SL**，振荡至菌体彻底悬浮。

革兰氏阳性菌：先进行溶菌酶破壁处理（如不确定为何种菌属，请按处理革兰氏阳性菌的方法进行）。向菌体沉淀中加入 200 μ l 溶菌酶缓冲液（**配制方法见自备试剂**），37°C 温育 30-60 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2 min，弃上清后向沉淀中加入 **200 μ l Buffer SL**，振荡至菌体彻底悬浮。

c) 加入 20 μ l Proteinase K（25 mg/ml）溶液，涡旋振荡混匀**进行步骤 2。**

精液

a) 取 **100 μ l** 精液，加入 **Buffer SL** 补足至 **200 μ l**。

b) 加入 **20 μ l Proteinase K（25 mg/ml）**和 **20 μ l DTT（1 M）**，涡旋振荡 15 s 混匀，**56°C 孵育 6 h**（最低不少于 5 h，最长不超过 12 h），期间每隔 30 min 涡旋混匀一次。

c) 孵育完成后**进行步骤 3。**

2. **可选步骤**：如果需要去除 RNA，可加入 10 μ l RNase A（25 mg/ml）溶液，涡旋混匀，室温放置 5 min。

3. 加入 **220 μ l Buffer VL**，涡旋振荡混匀，70°C 水浴 10 min，水浴后溶液应变清亮。

4. **可选步骤**：12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2 min，以除掉不能消化的类似于纤维/毛发/骨骼等杂质，防止柱子堵塞，进一步提高纯度。**将上清转移到一个新的离心管中，不要吸到沉淀杂质。**

5. 向上一步的溶液中加入 **220 μ l 无水乙醇**，涡旋混匀（此时可能会出现絮状沉淀，属于正常现象），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin

Columns AC) 中。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。

6. 向吸附柱 AC 中加入 **500 µl Buffer WB1**, 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液。
 7. 向吸附柱 AC 中加入 **600 µl Buffer WB2** (使用前请检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液。
 8. 重复步骤 7。
 9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管和废液。
注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会降低洗脱效率, 影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
 10. 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 **50-100 µl Buffer EB 或灭菌水**, 室温放置 3-5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液。 -20°C 保存 DNA。
注意: 1) Buffer EB 在 56°C 中预热可以增加产量。也可用无菌水洗脱, 但应确保其 PH 在 7.0-8.5 范围内。
2) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可以使用小于 100 µl EB 洗脱, 也可以将步骤 10 所得的 DNA 溶液重新加至吸附膜上, 再次离心洗脱。如果预期 DNA 的量小于 1 µg, 推荐用 50 µl Buffer EB 进行洗脱。
-