

Onestep-Lysis[®] Blood & Tissue & Cell Genomic DNA Kit**一步法血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒**目录号: **DNE24****试剂盒组成**

Component	DNE24-01 (50 preps)	DNE24-02 (100 preps)
Buffer LB	25 ml	50 ml
Buffer WB1	25 ml	50 ml
Buffer WB2	13 ml	25 ml
	第一次使用前按说明加指定量无水乙醇	
Buffer EB	10 ml	15 ml
10× Buffer RCL	15 ml	30 ml
RNase A (25 mg/ml)	500 μl	1 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml	1 ml x 2
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、培养细胞和处理成细胞悬液的动物组织中快速提取纯化基因组 DNA（包括 mtDNA 和感染的病毒 DNA）。由细胞裂解液快速溶解核膜，释放 DNA，并使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，纯化过程无需苯酚/氯仿等有机试剂。纯化得到的 DNA 可以直接用于 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 (µg)
哺乳动物全血	0.1-1 ml	3-25 µg
禽类、两栖类全血	5-10 µl	5-20 µg
细胞培养液	10 ⁵ -10 ⁷ cells	5-30 µg
动物组织	30 mg	2-30 µg

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. 所有离心步骤均在室温下进行。
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

1. 材料处理：

动物组织

- a) 取 5-25 mg 组织（脾脏组织用量应少于 10 mg）打碎成细胞悬液（不要有组织块）。
- b) 加入 500 µl Buffer LB 和 20 µl Proteinase K（20 mg/ml），涡旋振荡混匀，56°C 孵育 30 min，其间涡旋混匀一次。

注意：如需去除 RNA，可在裂解完成后加入 10 µl RNase A（25 mg/ml），室温放置 5 min 消化去除 RNA。

- c) 12,000 rpm (~13400×g) 离心 2 min，沉淀不能裂解的组织碎片，转移上清液（≤500 µl）至新的 1.5 ml 离心管中，进行步骤 2。

培养细胞

- a) **贴壁细胞：**先用胰蛋白酶将贴壁细胞处理成细胞悬液，转移至 1.5 ml 离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，留下细胞团。

悬浮细胞：收集约 10⁵-10⁷ 个悬浮细胞至 1.5 ml 离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，留下细胞团。

b) 向离心管中加入 **400 μ l Buffer LB** 和 **20 μ l Proteinase K (20 mg/ml)**, 涡旋振荡至无明显团块, 56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 进行步骤 2。

注意: 如需去除 RNA, 可在裂解完成后加入 **10 μ l RNase A (25 mg/ml)**, 室温放置 5 min 消化去除 RNA。

抗凝全血

a) **无核红细胞抗凝血 (哺乳类动物)**: 当血液体积 < 100 μ l 时, 直接加入 Buffer LB 补足至 400 μ l; 当体积为 0.1-1 ml 时, 加入两倍体积红细胞裂解液 Buffer RCL (试剂盒提供的 Buffer RCL 为 10x, 使用前用去离子水稀释至 1x), 颠倒混匀 10 次, 12,000 rpm (~13,400xg) 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, 可再加入两倍血液样品体积的红细胞裂解液 RCL 将沉淀重悬后重复裂解一次)。注意: 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 抗凝血进行下一步。

b) 加入 **400 μ l Buffer LB** 和 **20 μ l Proteinase K (20 mg/ml)**, 涡旋振荡至无明显块状沉淀, 56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 进行步骤 2。

2. 冷却至室温后, 加入 **0.5 倍上清体积** 的异丙醇, 涡旋振荡充分混匀 (此时可能会出现絮状沉淀, 不影响提取进程), 将得到的溶液和可能出现的絮状沉淀全部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。

3. 向吸附柱 AC 中加入 **500 μ l Buffer WB1**, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。

4. 向吸附柱 AC 中加入 **600 μ l Buffer WB2** (使用前请检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。

5. 重复步骤 4。

6. 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)。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 可以将吸附柱开盖放置几分钟, 以彻底晾干残余乙醇。

7. 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 μ l 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 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

注意: 1) Buffer EB 在 56 $^{\circ}$ 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 μ l EB 洗脱, 也可以将步骤 7 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 μ g, 推荐用 50 μ l Buffer EB 进行洗脱。
