

Animal Genomic DNA Kit (Proteinase K)

动物基因组DNA提取试剂盒

(全能型蛋白酶K)

目录号：A O 3 1 0 4

试剂盒组成

Component	A O 3 1 0 4 (5 0 T)	A O 3 1 0 4 (1 0 0 T)
Buffer SL	1 5 ml	2 5 ml
Buffer VL	1 5 ml	2 5 ml
Buffer WB1	2 5 ml	5 0 ml
Buffer WB2 (concentration)	1 3 ml	2 5 ml
Buffer WB2 (concentration)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer EB	1 0 ml	2 0 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml	1 ml x 2
RNase A (10 mg/ml)	2 0 0 μl	4 0 0 μl
Spin Columns AC with Collection Tubes	5 0	1 0 0

保存方法

室温 (1 5 - 3 0 °C) 保存。

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。

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。

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

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下降。

储存温度低时若缓冲液SL或VL中有沉淀，可在37℃水浴中重新溶解，摇匀后使用。

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！

本试剂盒可选配Buffer RCL用于血液DNA提取。

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

材料处理

动物组织

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℃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

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（选配的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（~13,400×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5×10⁶个细胞），10,000 rpm（~11,200×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；

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

取0.5 - 2 ml细菌培养液（最多不超过2×10⁹个细胞），10,000 rpm（~11,500×g）离心1 min，尽可能的吸弃上清，收集细菌沉淀。

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℃温育 30 - 60 min，12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）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。

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

精液

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

加入 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml) 和 20 μ l DTT (1 M)，涡旋振荡 15 s 混匀，56℃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。

孵育完成后进行步骤 3。

可选步骤：如果需要去除 RNA，可加入 4 μ l RNase A (10 mg/ml) 溶液，涡旋混匀，室温放置 5 min。

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

可选步骤：12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）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。

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。

向吸附柱 AC 中加入 500 μ l Buffer WB1，12,000 rpm 离心 30 s，倒掉废液。

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，倒掉废液。

重复步骤 7。

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）。

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℃保存 DNA。

注意：1) Buffer EB 在 56℃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 μ g,推荐用50 μ l Buffer EB进行洗脱。