

昆虫组织基因组DNA 提取试剂盒

(兼容低微量)

AT3018-01/02 使用说明书

产品简介

本试剂盒采用安全无毒的裂解液配方，应用特殊的裂解条件将昆虫组织中的 DNA 释放出来。整个提取过程安全、便捷，提取的基因组 DNA 纯度高，质量稳定可靠，可兼容低微量起始的昆虫样本提取。提取产物可进行多种下游应用，如 PCR、NGS 捕获测序、Real-time PCR、SNP 基因分析 STR 基因分析、药物基因组学研究等。

试剂盒组成

组 分	AT3019-01		保存条件
	(50 次)	(200 次)	
裂解液 KL	20 mL	80 mL	室温
缓冲液 TN	7.5 mL	30 mL	室温
蛋白酶 K (20mg/ml)	1 mL	4 mL	室温
洗脱液 TE	2.5 mL	10 mL	室温

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成；
2. 操作过程请注意避免样本之间的交叉污染；
3. 请使用 DNase/RNase-Free 的枪头、EP 管进行试验；

需自备试剂和耗材

无水乙醇，DNase/RNase-Free H₂O，RNase A (100 mg/ml)；各类移液吸头；1.5mL 离心管；

操作步骤 1. 样本处理

1. 样本处理
 - a. 乙醇保存虫体：小心取出昆虫放在滤纸上 2min，使乙醇挥发完全；
 - b. 冷冻保存可直接进入步骤 2；
2. 在 2ml 离心管中加入研磨珠 15 颗（二氧化锆），加入 400 μ l 昆虫裂解液 KL，再将昆虫装入管内，50-60Hz 研磨 180s。
3. 在研磨好的管内加入 10 μ l 蛋白酶 K（20mg/ml），混匀，瞬时离心，58℃水浴过夜。
4. 第二天，在管内加入 5 μ l 蛋白酶 K（20mg/ml），混匀，58℃继续水浴 1-2h，瞬时离心，转上清至新的 1.5ml 离心管。
5. **（可选步骤）** 如果要去除 RNA，可以将样品中加入 2 μ l RNase A（100 mg/ml，客户自备），室温孵 2 min 后，进行下一步操作。
6. 在管内加入 150 μ l 缓冲液 TN，涡旋混匀。
7. 室温 $\geq$ 12000rpm 离心 5min，小心吸取上清至 1.5ml 新管中，不要扰动下部沉淀。

注：若此时沉淀与上清分层不明显，可延长离心时间直至有明显分层，切勿吸到下部沉淀。
8. 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，颠倒混匀，-80℃放置 30min（或-20℃放置过夜）。
9. 离心机提前预冷到 4℃， $\geq$ 12000rpm 离心 30min，小心移除上清，保留沉淀。
10. 加入 1ml 预冷的 70%乙醇， $\geq$ 12000rpm 离心 3min，小心移除上清，保留沉淀。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 用 200 μ l 枪头小心移除残留乙醇，开盖晾干，直至管内壁无乙醇残留。
13. 加入 20-50 μ l 无核酶水或洗脱液 TE 溶解沉淀。
14. 根据要求使用 Nanodrop 或者 Qubit 对 DNA 进行浓度测定，DNA 保存在-20℃。

常见问题 Q1: DNA 产量低

Q1: DNA 产量低

A1: 样品消化不充分：外壳坚硬的昆虫样本可延长研磨时间；步骤 7 切勿吸到下部沉淀。

A2: 若是乙醇保存的样本，裂解前确保乙醇已经挥发完全。

A3: 裂解不充分：对于低微量起始的样本需保证足够的裂解时间，确保第二天再次加入蛋白酶 K，继续水浴 1-2h。

A4: 裂解时间过长：裂解时间过长可能导致 DNA 降解及产量低，裂解时间不超过 16h。

A5: 乙醇：无水乙醇提前预冷；70%提前预冷，现配现用。

A6: 沉淀不充分：加预冷无水乙醇沉淀时间最长可选取-20℃过夜，也可适当延长-80℃沉淀至 1h，最长不要超过 1h。

A7: DNA 沉淀溶解不充分：洗脱液需保证 pH 值在 7.5-8.5 之间，并提前预热。

A8: 蛋白酶 K 活性下降：使用保质期内的蛋白酶 K，超过保质期请更换试剂。

Q2: DNA 纯度不达标

A: 参考 1 和 2 中的解决方案。

Q3: RNA 残留

A: 加入 RNASE 处理：加入 2~5μl RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 2-15min。

昆虫组织基因组DNA 提取试剂盒

(离心柱型)

AT3019-01 使用说明书

产品简介

本试剂盒采用安全无毒的裂解液配方，应用特殊的裂解条件将昆虫组织中的 DNA 释放出来。配合特异性的 DNA 离心吸附柱和独特缓冲液系统去除杂质蛋白及其他有机化合物，得到高纯度 DNA。

整个提取过程安全、便捷，提取的基因组 DNA 纯度高，得率高，质量稳定可靠。提取产物可进行多种下游应用，如 PCR、NGS 捕获测序、Real-time PCR、SNP 基因分析 STR 基因分析、药物基因组学研究等。

试剂盒组成

产品成分	AT3019-01 (50 次)	保存条件
裂解液 KL	20 mL	室温
缓冲液 TN	7.5 mL	室温
蛋白酶 K	1 mL	室温
缓冲液 TW1	15 mL	室温
缓冲液 TW2	26 mL	室温
洗脱液 TE	5 mL	室温
吸附柱	50 个	室温
收集管	50 个	室温

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成；
2. 操作过程请注意避免样本之间的交叉污染；
3. 请使用 DNase/RNase-Free 的枪头、EP 管进行试验；
4. 若裂解液 KL 出现沉淀，可在 37°C 水浴至沉淀消失后使用；
5. 初次使用时，请按照缓冲液 TW1、TW2 试剂瓶标签上的指示，加入无水乙醇，并做好标记；

需自备试剂和耗材

无水乙醇；DNase/RNase-Free H₂O；各类移液吸头；1.5mL 离心管；研磨珠；

操作步骤 1. 样本处理

1. 样本处理

- a. 乙醇保存虫体：小心取出昆虫放在滤纸上 2min，使乙醇挥发完全；
- b. 冷冻保存可直接进入步骤 2；

2. 在 2ml 离心管中加入研磨珠 15 颗（二氧化锆），加入 400 μ l 昆虫裂解液 KL，再将昆虫装入管内，50-60Hz 研磨 180s；
3. 在研磨好的管内加入 15 μ l 蛋白酶 K（20mg/ml），混匀，58 $^{\circ}$ C 水浴 2-16h，瞬离，转移全部上清至新的 1.5ml 离心管；

注：水浴时间不超过 16 小时。此时上清约为 400 μ l，吸到少量沉淀不影响后续实验。

4. **（可选步骤）** 如果要去除 RNA，可以将样品中加入 2 μ l RNase A（100 mg/ml，客户自备），室温孵 2 min 后，进行下一步操作；
5. 在管内加入 150 μ l 缓冲液 TN，充分混匀；
6. 12000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g)室温离心 5min，小心吸取上清至 1.5ml 新管中，不要扰动下部沉淀；

注：若此时沉淀与上清分层不明显，可延长离心时间直至有明显分层。

7. 加入上步上清的 2 倍体积无水乙醇，充分混匀，瞬时离心；
8. 将上一步混合液转入吸附柱中，8000rpm($\sim$ 6,000 $\times$ g)室温离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管；

注：吸附柱最大容量为 750 μ l，可将剩余液体重复上述步骤过柱，直至溶液全部过柱。

9. 向吸附柱中加入 500 μ l 缓冲液 TW1，8000rpm($\sim$ 6,000 $\times$ g)室温离心 30s，倒掉废液，重新将吸附柱放回收集管中；
10. 向吸附柱中加入 700 μ l 缓冲液 TW2，8000rpm($\sim$ 6,000 $\times$ g)室温离心 30s，倒掉废液，重新将吸附柱放回收集管中；
11. 重复步骤 10；
12. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g)，离心 2 min，倒掉废液。将吸附柱开盖置于室温放置 2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；
13. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 65 $^{\circ}$ C 预热的 50-100 μ l 洗脱缓冲液 TE 或 ddH₂O 洗脱，室温放置 2-5min，12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 2 min，将收集有 DNA 的离心管-20 $^{\circ}$ C 保存；

常见问题 Q1：柱子堵塞

Q1： 柱子堵塞

A1： 样品用量太多：起始量与 DNA 分离的组织类型、大小和数量均有关系，建议样品组织小于 50mg，过多的样品量不但不会增加产量，反而可能会导致柱子堵柱。

A2： 样品消化不充分：外壳坚硬的昆虫样本可延长研磨时间，步骤 7 切勿吸到下部沉淀。

Q2: DNA 产量低

A1： 参考 1 柱子堵塞解决方案。

A2： 若是乙醇保存的样本，裂解前确保乙醇已经挥发完全。

A3： 裂解不充分：延长裂解时间。

A4： 裂解时间过长：裂解时间过长可能导致 DNA 降解及产量低，裂解时间不超过 16h。

A5： 缓冲液 TW1/TW2 没有加入乙醇稀释。

A6： 洗脱不充分：洗脱液需保证 pH 值在 7.5-8.5 之间，并提前预热；洗脱液需加到膜中央；增加洗脱体积或次数。

A7： Proteinase K 活性下降：使用保质期内的蛋白酶 K，超过保质期请更换试剂。

A8： 若是低微量样本（如螨虫），请使用本司另一款昆虫组织基因组 DNA 提取试剂盒 AT3018。

Q3: DNA 纯度不达标

A： 参考 1 和 2 中的解决方案。

Q4: RNA 残留

A： 加入 RNASE 处理：加入 2~5μl RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 2-15min。