

Flexikit™ 组织/细菌/酵母基因组 DNA 提取试剂盒

一、试剂盒组成

Cat.NO.	526-050
制备次数	50 次
DR Buffer	50ml
PE solution	60ml
DE Buffer	15ml×2
Proteinase K 干粉	11mg×2
RNase A 溶液	30μl×4
说明书	1

二、产品说明

类型	溶液型
制备速度	35 分钟/单次制备
单次处理样品量	可缩放的数量
下游应用	Southern blot, 限制性酶切, PCR, 基因型分析等

三、注意事项

1. Proteinase K 干粉需 4 度保存，溶解后于-20 度保存。
2. RNase A 溶液于 4 度或-20 度保存。

四、实验前准备

1. 向每管Proteinase K干粉中加入 0.275ml灭菌ddH₂O和 0.275ml甘油，-20℃储存。也可以选择在冻干蛋白酶K粉末中加入 0.55ml水，分装成小的等份储存在-20 度或-80 度，避免反复冻融。在使用或者分装前将冻干蛋白酶K粉末完全溶解，在室温下溶解大概需要 15-30 分钟。
2. 请准备 60℃水浴或其它加热设备。
3. 在温度较低时注意观察 DR 和 PE 中是否有沉淀，如有请将缓冲液在 37 度温育溶解。
4. 请准备 70%乙醇、异丙醇(99-100%)。
5. 请准备 50ml 离心管。
6. 请将 **PE Solution** 放在 4 度冰箱预冷。
7. 样品处理
 - A. 效果最好的处理方式是用研钵和研磨杵将组织在液氮中研磨成粉末，或者将组织在适当体积的 DR Buffer 中进行匀浆。
 - B. 如果没有研磨器材，可用剪刀或刀片将组织切割成小片放在加有蛋白酶 K 的适量的 DR Buffer 中消化过夜。
 - C. 新鲜组织需用 1×PBS 清洗掉多余的血液。在称重前用吸水纸吸干多余的液体。

五、操作步骤

根据样品材料选择相应的操作方法(表1):

表-1

样品量	样品材料	建议方法
≤ 50 mg	纤维组织 (muscle, heart) 骨组织(mouse tail) 软组织 (肝脏、肾、脑、脾)	蛋白酶 K 消化 (操作方法 A)
	软组织 (肝脏、肾、脑)	注射器匀浆(操作方法 C)
50-400 mg	软组织/纤维组织/骨组织	蛋白酶 K 消化(操作方法 B)
	细菌培养物	蛋白酶 K 消化(操作方法 D)

操作方法 A: 【Proteinase K 处理组织(≤50mg)的操作方法】

1a. 用液氮将组织(≤50mg)充分研磨后, 迅速转移至 2ml 灭菌离心管中, 加入 400μl DR Buffer, 旋涡混匀, 继续第 2 步。

*** 转移样品要迅速, 避免融化。**

1b. 将组织(≤50mg)放入 2ml 离心管中, 加入 400μl DR Buffer, 匀浆样品或将样品切割成小片。

2. 加入 10μl Proteinase K 溶液至样品悬浮液中混匀, 60 度孵育直到溶液变得清亮。

*** 在孵育过程中不时翻转混合, 有助于样品裂解。**

*** 裂解时间取决于组织类型, 通常裂解过夜可以获得较高产量的 DNA。**

*** 裂解完全后, 在 70 度水浴中预热 DE Buffer 用于第 13 步洗脱。**

3. 加入 1μl RNase A 溶液至裂解混合物中, 室温放置 10 分钟。

4. 加入 500μl 预冷的 PE Solution, 旋涡振荡 10 秒, 4 度放置 10 分钟。

5. 20,000×g 离心 10 分钟。

6. 吸取约 800μl 上清至 1 个新的 1.5ml 离心管中, 避免吸到蛋白沉淀或油脂层。

7. 加入 0.1 倍体积(约 80μl)的**异丙醇**至上清, 颠倒混合均匀。20,000×g, 4 度离心 5 分钟。

*** 按照第 6 步中所收集上清的实际体积调节加入异丙醇的体积。**

*** 加入异丙醇后, 一定要混合均匀。**

8. 吸取上清至 1 个新的离心管内, 加入 0.3 倍体积(约 240μl)的**异丙醇**, 温和翻转 10 秒。

*** 加入异丙醇后, 一定要混合均匀。**

9. 20,000×g, 4 度离心 5 分钟。小心弃上清, 切勿吸取到 DNA 沉淀。

10. 加入 1ml 70%乙醇, 温和翻转数秒清洗 DNA 沉淀。

11. 20,000×g, 4 度离心 2 分钟。小心弃上清, 切勿吸取到 DNA 沉淀。

12. 室温晾干 DNA 沉淀。

*** 确保 DNA 沉淀完全干燥, 以防残留乙醇影响后续实验。**

*** 切勿在较高的温度下烘干或真空干燥 DNA 沉淀, 以防降低 DNA 沉淀在 DE Buffer 中的溶解性。**

13. 加入 200μl DE Buffer 溶解 DNA 沉淀。

*** 推荐 4 度过夜溶解 DNA 沉淀。**

*** 或 60 度孵育 5-10 分钟或室温放置 1 小时以上。**

操作方法 B: 【Proteinase K 处理组织(50-400mg)的操作方法】

1a. 用液氮将组织 (50-400mg)充分研磨后, 迅速转移至 50ml灭菌离心管中, 加入适当的DR Buffer([表-2](#)), 旋涡混匀, 继续第 2 步。

*** 转移样品要迅速，避免融化。**

1b. 将组织(50-400mg)放入 50ml离心管中，加入适当的DR Buffer(表-2)，匀浆样品或将样品切割成小片。

表-2

溶液	计算公式 $V = \text{所需体积}(\mu\text{l})$ $N = \text{组织量}/50$	50 mg 组织 N=1	100 mg 组织 N=2	200 mg 组织 N=4	400 mg 组织 N=8
DR Buffer	$V = 400 * N$	400 μL	800 μL	1600 μL	3200 μL
Proteinase K 溶液	$V = 10 * N$	10 μL	20 μL	40 μL	80 μL
RNase A solution	$V = 1 * N$	1 μL	2 μL	4 μL	8 μL
PE solution	$V = 500 * N$	500 μL	1000 μL	2000 μL	4000 μL
70%乙醇	$V = 1000 * N$	1 mL	2 mL	4 mL	8 mL
DE Buffer	$V = 200 * N$	200 μL	400 μL	800 μL	1600 μL

2. 加入Proteinase K(表-2)溶液至样品悬浮液中混匀，60 度孵育直到溶液变得清亮。

*** 在孵育过程中不时翻转混合，有助于样品裂解。**

*** 裂解时间取决于组织类型，通常裂解过夜可以获得较高产量的DNA。**

*** 裂解完全后，在70 度水浴中预热DE Buffer 用于第13 步洗脱。**

3. 加入RNase A溶液(表-2)至裂解混合物中，室温放置 10 分钟。

4. 加入预冷的PE Solution(表-2)，旋涡振荡 10 秒，4 度放置 10 分钟。

5. 5,000×g，4 度离心 10 分钟。

6. 吸取上清至 1 个新的 50ml 离心管中，避免吸到蛋白沉淀或油脂层。

7. 加入 0.1 倍体积的异丙醇至上清，颠倒混合均匀。5,000×g，4 度离心 10 分钟。

*** 按照第6 步中所收集上清的实际体积调节加入异丙醇的体积。**

*** 加入异丙醇后，一定要混合均匀。**

8. 吸取上清至 1 个新的 50ml 离心管内，加入 0.3 倍体积的异丙醇，温和翻转 10 秒。

*** 加入异丙醇后，一定要混合均匀。**

9. 5,000×g，4 度离心 3 分钟。小心弃上清，切勿吸取到 DNA 沉淀。

10. 加入 70%乙醇(表-2)，温和翻转数秒清洗DNA沉淀。

11. 5,000×g，4 度离心 1 分钟。小心弃上清，切勿吸取到 DNA 沉淀。

12. 室温晾干 DNA 沉淀。

*** 确保 DNA 沉淀完全干燥，以防残留乙醇影响后续实验。**

*** 切勿在较高的温度下烘干或真空干燥 DNA 沉淀，以防降低 DNA 沉淀在 DE Buffer 中的溶解性。**

13. 加入DE Buffer(表-2)溶解DNA沉淀。

*** 推荐4 度过夜溶解DNA 沉淀。**

*** 或60 度孵育5-10 分钟或室温放置1 小时以上。**

操作方法 C: 【注射器匀浆组织(≤50mg)的操作方法】

1. 用液氮将组织(≤50mg)充分研磨后，迅速转移至 2ml 灭菌离心管中，加入 400 μl DR Buffer，旋涡混匀，继续第 2 步。

*** 转移样品要迅速，避免融化。**

2. 将 25 号针头注射器的针头插入组织悬浮液中，反复抽吸悬浮液直到看不见组织块。

*** 看不到组织块说明溶液完全混匀。**

*** 抽吸的动作要温和，避免出现气泡。**

*** 裂解完全后，在70 度水浴中预热DE Buffer 用于第13 步洗脱。**

3. 加入 1 μ l RNase A 溶液至裂解混合物中，室温放置 10 分钟。
4. 加入 500 μ l 预冷的 PE Solution，旋涡振荡 10 秒，4 度放置 10 分钟。
5. 20,000 \times g，4 度离心 10 分钟。
6. 吸取约 800 μ l 上清至 1 个新的 1.5ml 离心管中，避免吸到蛋白沉淀或油脂层。
7. 加入 0.1 倍体积(约 80 μ l)的**异丙醇**至上清，颠倒混合均匀。20,000 \times g，4 度离心 5 分钟。
 - *按照第 6 步中所收集上清的实际体积调节加入异丙醇的体积。
 - *加入异丙醇后，一定要混合均匀。
8. 吸取上清至 1 个新的离心管内，加入 0.3 倍体积(约 240 μ l)的**异丙醇**，温和翻转 10 秒。
 - *加入异丙醇后，一定要混合均匀。
9. 20,000 \times g，4 度离心 5 分钟。小心弃上清，切勿吸收到 DNA 沉淀。
10. 加入 1ml 70%乙醇，温和翻转数秒清洗 DNA 沉淀。
11. 20,000 \times g，4 度离心 2 分钟。小心弃上清，切勿吸收到 DNA 沉淀。
12. 室温晾干 DNA 沉淀。
 - *确保 DNA 沉淀完全干燥，以防残留乙醇影响后续实验。
 - *切勿在较高的温度下烘干或真空干燥 DNA 沉淀，以防降低 DNA 沉淀在 DE Buffer 中的溶解性。
13. 加入 200 μ l DE Buffer 溶解 DNA 沉淀。
 - *推荐 4 度过夜溶解 DNA 沉淀。
 - *或 60 度孵育 5-10 分钟或室温放置 1 小时以上。

操作方法 D: 【细菌基因组 DNA 提取】

- *此方法适用于革兰氏阴性细菌的基因组 DNA 提取。
1. 收集 2ml 细菌过夜培养物 (OD₆₀₀~3.5)，16,000 \times g 离心 2 分钟，尽可能彻底去除上清。
 - *使用新鲜的过夜培养物可获得最好的提取效果。
 - *如果 OD₆₀₀ 高于 3.5，按比例减小样品体积防止过量。
 2. 加入 500 μ l DR Buffer 和 2 μ l RNase A solution，用移液器重悬细菌沉淀。
 3. 37 度温育 10 分钟，每隔 3 分钟旋涡混匀。
 4. 加入 20 μ l Proteinase K 溶液，混匀。
 5. 60 度孵育 10 分钟，每 3 分钟颠倒混匀。
 6. 加入 500 μ l 预冷的 PE solution，旋涡混匀，4 度放置 10 分钟。
 7. 20,000 \times g，4 度离心 10 分钟。
 8. 吸取约 1000 μ l 上清至 1.5ml 离心管中，切勿吸到任何沉淀。
 9. 加入 0.4 倍体积(约 400 μ l)的**异丙醇**，温和翻转 10 秒。
 - *按照第 8 步中所收集上清的实际体积调节加入异丙醇的体积。
 - *加入异丙醇后，一定要混合均匀。
 10. 20,000 \times g，4 度离心 5 分钟。小心弃上清，切勿吸收到 DNA 沉淀。
 11. 加入 1ml 70%乙醇，温和翻转数秒清洗 DNA 沉淀。
 12. 20,000 \times g，4 度离心 2 分钟。小心弃上清，切勿吸收到 DNA 沉淀。
 13. 室温晾干 DNA 沉淀。
 - *确保 DNA 沉淀完全干燥，以防残留乙醇影响后续实验。
 - *切勿在较高的温度下烘干或真空干燥 DNA 沉淀，以防降低 DNA 沉淀在 DE Buffer 中的溶解性。
 14. 加入 200 μ l DE Buffer 溶解 DNA 沉淀。
 - *推荐 4 度过夜溶解 DNA 沉淀。
 - *或 60 度孵育 5-10 分钟或室温放置 1 小时以上。

生产商：基因科技（上海）有限公司
地址：上海市桂箐路 69 号 25 号楼 6 楼
电话：021-51876181
传真：021-64957610
网址：www.genetech.com.cn