



## Flexikit™ 组织/细菌/酵母基因组 DNA 提取试剂盒

### 一、试剂盒组成

Cat.NO.	529-050
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	25mg 哺乳动物组织、2-3ml 细菌或酵母过夜培养物
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 ddH<sub>2</sub>O 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，切勿吸取得到 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，切勿吸取得到 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 = 所需体积(μl) N = 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 400μl 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 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，4 度离心 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×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 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 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 (OD<sub>600</sub>~3.5)，16,000×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 OD<sub>600</sub> 高于 3.5，按比例减小样品体积防止过量。
2. 加入 500μl DR Buffer 和 2μl 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 20μl 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 500μl 预冷的 PE solution，旋涡混匀，4 度放置 10 分钟。
7. 20,000×g，4 度离心 10 分钟。
8. 吸取约 1000μl 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 400μl)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×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×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 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。

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](http://www.genetech.com.cn)