

## 动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（脾、肺、肾）（磁珠法）

货号：MBD01A

### 【概述】

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和缓冲液系统，可从样品中分离纯化高质量基因组 DNA。经特殊包被的磁珠在一定条件下对目的 DNA 具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的 DNA，能够达到快速分离纯化 DNA 的目的。整个过程安全、便捷，提取的 DNA 纯度高。使用本试剂盒纯化的基因组 DNA 的 OD260/OD280 均在 1.8-2.0 之间，可以应用到 PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。

### 【适用范围】

本试剂盒适合从动物组织（脾、肺、肾）中提取基因组 DNA。不同组织类型取样量参照下面表格：

材料	取样量
脾脏	10-50 mg
肺脏	10-50 mg
肾脏	10-50 mg

### 【试剂盒包装及组成】

试剂盒组成	规格			
	10T	50T	100T	200T
裂解液 S1	5.5 mL×1	27 mL×1	54 mL×1	108 mL×1
裂解液 S2	1.7 mL×1	8.5 mL×1	17 mL×1	34 mL×1
缓冲液 W2	5.5 mL×1	27.5 mL×1	55 mL×1	110 mL×1
蛋白酶K (20 mg/mL)	0.22 mL×1	1.1 mL×1	2.2 mL×1	4.4 mL×1
磁珠	0.55 mL×1	1.4 mL×2	5.6 mL×1	11 mL×1
漂洗液	/	1 (空瓶)	1 (空瓶)	1 (空瓶)
洗脱液	1.5 mL×1	7.5 mL×1	15 mL×1	30 mL×1
使用说明书	1 份	1 份	1 份	1 份
磁铁	1 块	/	/	/

### 【储存条件】

- 磁珠可以在室温下（15-25℃）运输，但请置于 2-8℃ 保存。
- 蛋白酶K 需-20℃ 保存，以保证其活性。
- 本试剂盒其余试剂室温保存，有效期 12 个月，更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃ 保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在 37℃ 水浴中预热 10 min 溶解沉淀，摇匀后使用。

**【注意事项】**

- 尽量使用新鲜的样本。
- 整个裂解过程操作尽量温和，并在要求时间内完成。
- 在需要吸取上清液的步骤中应避免吸到沉淀，以免影响产物纯度。
- 客户自备材料：液氮、异丙醇、无水乙醇、研钵及研钵棒、药匙、离心管、水浴锅、离心机（最大离心力  $\geq 12000$  rpm/min ( $\sim 10010 \times g$ )）。
- 如果需要去除 RNA，可加入 60  $\mu$ L RNase A (10 mg/mL) 溶液，客户自备，可根据需要从本公司购买。
- 请于本实验开始前穿上实验服、佩戴手套及口罩，避免实验操作过程中试剂沾染皮肤、眼睛等。如不慎发生以上情况，请立即用清水冲洗，必要时请及时就医。
- 使用前请预先在漂洗液瓶或离心管中配制 70%乙醇，并提前将水浴锅调至 65 $^{\circ}$ C 备用。
- 磁珠在使用前一定要充分混匀。磁珠加入后，请尽量减少用枪头吹打混匀，防止磁珠沾在枪头上，造成基因组 DNA 损失。

**【操作步骤】**

1. 取动物组织 10-50 mg，于液氮中充分研磨（**请注意防护，防止研磨过程中液氮冻伤皮肤**），并迅速转移到 2 mL 离心管中，加入 480  $\mu$ L 裂解液 S1，迅速颠倒混匀，再向离心管中加入 150  $\mu$ L 裂解液 S2 以及 20  $\mu$ L 蛋白酶 K，颠倒混匀，使样本重悬于溶液中。

- 样本研磨前，请先用液氮将研钵、研钵棒充分预冷；为方便将粉末转移至离心管，可提前将离心管及药匙预冷。
- 样本研磨是否充分，会直接影响基因组 DNA 的得率。为确保研磨充分，可将动物组织尽量剪成小块，放入研钵，加液氮充分碾压研磨至粉末状，再加入少量液氮，研磨至干粉状。用药匙将粉末迅速转移至离心管中。
- 本步骤中加入裂解液后，可采用涡旋混匀的方式，使动物组织粉末完全处于悬浮状态。后续步骤中不建议再采用涡旋混匀的方式，并注意操作尽量温和，以防止基因组 DNA 断裂。
- 如需去除 RNA，请于本步骤同时加入 60  $\mu$ L RNase A (10 mg/mL) 溶液。
- 当样本量大于 50 mg 时，请按比例增大裂解液的体积，否则可能会影响 DNA 的得率。

2. 将离心管置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中，水浴 40 min，期间颠倒混匀数次。

- 本步骤裂解结束后，为方便后续步骤（步骤 9）使用，请将水浴锅调至 56 $^{\circ}$ C。

3. 室温放置 3-5 min，加入 500  $\mu$ L 的缓冲液 W2，颠倒混匀，4 $^{\circ}$ C 条件下，12000 rpm ( $\sim 10010 \times g$ )，离心 5-10 min。

4. 取出离心管，小心吸取 600  $\mu$ L 上清于新的 2 mL 离心管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀 10 sec，再向离心管中加入 50  $\mu$ L 磁珠，振荡混匀 1 min，室温静置 3 min，期间颠倒混匀 2 次。

- 吸取上清时，请勿触及沉淀或管底。
- 向离心管中加入磁珠之前，请确保磁珠彻底重悬，可在使用前振荡混匀。

- 请确保磁珠在结合过程中呈悬浮状态。如磁珠加入后呈团状、丝状或颗粒状，可适当增加振荡力度及次数。

#### 5. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，吸弃废液，从磁力架或磁铁上取下离心管。

- 若离心管管口及管壁上沾有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管，可参考如下步骤：将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附于管壁后，上下颠倒磁力架，使沾在管口的磁珠重悬至溶液中，避免磁珠损失。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 本公司有多功能磁力架（Mag0103），无需使用移液器吸净废液，直接倾斜磁力架将废液倒出即可，可根据需要购买。

#### 6. 向离心管中加入 600 $\mu$ L 漂洗液（使用前请预先配制 70%乙醇），轻柔混匀 1-2 min，将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，吸弃废液。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。

#### 7. 重复步骤 6 一次。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm ( $\sim 6953\times g$ ) 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。

#### 8. 室温开盖晾干 5-10 min（可将离心管开盖置于超净工作台或吹风机冷风口），至乙醇完全挥发（侧面观察磁珠无反光；反面观察磁珠颜色由棕黑色变为深褐色，边缘龟裂；无液体挂壁）。

- 室温晾干前，请先尽量吸净残液。乙醇残留会抑制后续的酶反应（如酶切、PCR 等）实验，应确保乙醇完全挥发后再进行下一步操作。但也不能干燥太久（磁珠不能完全龟裂），以免 DNA 难以洗脱。

#### 9. 从磁力架或磁铁上取下离心管，加入 100 $\mu$ L 洗脱液，振荡混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，每隔 2-3 min 轻摇离心管混匀 3-5 次。

- 水浴前请先用洗脱液将离心管壁上的所有磁珠冲洗至离心管内。
- 如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。但应保证去离子水的 pH 值在 7.0-8.5 之间，若 pH 值不在此范围内，会影响洗脱效率。

#### 10. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，小心吸取上清至新的离心管中，所得上清即目的 DNA，可直接进行下游实验或于适当条件保存。

- 可先将离心管 10000 rpm ( $\sim 6953\times g$ ) 离心 1 min，再进行磁分离，以确保所有磁珠完全吸附至管壁。
- 尽量吸净上清，但请勿吸入磁珠，以免影响基因组 DNA 的纯度及 DNA 溶液的颜色。

**【常见问题及参考意见】****1.得率低**

- 样品没有研磨充分：请将样品研磨至粉末状；
- 样品没有完全裂解完，裂解时间不够：可适当延长裂解时间，最长不应超过 60 min。
- 结合不充分：结合过程中要使磁珠一直处于悬浮状态，并且充分颠倒混匀；
- 取样量大于说明书给出量：取样量请严格按照说明书操作；
- 操作过程中磁珠损失：操作过程中可能有少量磁珠沾在离心管管口或枪头上，应及时确保磁珠重悬至溶液中，避免磁珠损失；
- 洗脱液 pH 不在推荐范围内：应使用本试剂盒配套洗脱液，如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。但应保证去离子水的 pH 值在 7.0-8.5 之间，若 pH 值不在此范围内，会影响洗脱效率；
- 洗脱温度不符合要求：洗脱过程需要 56℃ 水浴。56℃ 条件下磁珠与基因组 DNA 的作用力减弱，释放吸附的大量基因组 DNA，而常温条件下只能少量的基因组 DNA。

**2.DNA 条带弥散，DNA 断裂、降解**

- 样品不新鲜或反复冻融多次：尽量用新鲜样品进行实验，如果样品需要保存，可根据实验，分装保存样品，尽量避免反复冻融；
- 研磨时间太长，造成 DNA 降解：请迅速研磨，防止 DNA 降解；
- 研磨温度太高：样本研磨前应用液氮将研钵、研钵棒等研磨过程中用到的其他材料充分预冷；
- 裂解时间太长：裂解时间不要超过 60 min；
- 操作过程过于剧烈：操作过程动作尽量温和，避免 DNA 被机械打断；
- 提取后模板 DNA 放置时间太长：提取后如有需要，请尽量及时进行电泳实验。短期内可置于 4℃ 保存，长期请置于 -20℃ 保存（尽量注意避免反复冻融）。

**3. DNA 溶液有颜色**

- 洗涤过程不充分：如果结合后磁珠呈团状、丝状或颗粒状，可适当增加振荡力度及次数；
- 裂解不充分：将组织充分研磨、适当增加裂解液 S1 和 S2 用量，也可以延长裂解时间；
- 样品用量大于说明书给出量而其他试剂用量没有相应调整：严格按照说明书操作，如果需要增大样本量，可以等比例大试剂用量；
- DNA 溶液中混入磁珠：洗脱结束后，可先将离心管 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再进行磁分离，以确保所有磁珠完全吸附至管壁。为防止吸入磁珠，可重复进行磁分离一次。

**4. DNA 样品不纯，干扰后续实验**

- DNA 溶液有乙醇残留：吸弃废液时，请尽量吸净管盖及管底残液。为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。室温晾干至磁珠表面无反光、无液体挂壁；
- 磁珠洗涤不充分：加入 70%乙醇时，请确保所有磁珠均重悬于液体中，并充分振荡混匀；
- DNA 溶液中吸入磁珠：如果不小心吸入磁珠，请将上清液返回原管，待磁珠完全吸附至管壁后重新吸取上清。或者将吸取的上清液 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再取上清；
- DNA 溶液中含有蛋白质等杂质：建议适当减少样品用量；
- DNA 溶液中含有轻微盐离子等杂质，此为洗脱液正常现象，不影响下游实验。如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。为方便实验，可将获得的 DNA 溶液置于 -20℃ 环境分装保存。