

## 五、操作步骤

### 1. 组织培养细胞

- 收集细胞到一个 1.5ml 离心管，对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- 13,000rpm 离心 10 秒，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团和大约 10–50 $\mu$ l 残留的液体。
- 加 200 $\mu$ l PBS 重悬洗涤细胞，重复上述步骤 1b，弃 PBS 后高速涡旋振荡重悬细胞团。  
对于细胞核裂解液裂解效果不好的细胞系（例如 PC12 细胞）在做下一步骤（步骤 1d）前应该做几次冻—融循环：冻于液氮后，在 95 $^{\circ}$ C 水浴融化，重复 4 次。
- 加入 600 $\mu$ l 细胞核裂解液，用大口径的吸头（剪去吸头尖）轻柔吹打裂解细胞直至看不见细胞团块。
- 接步骤 4 继续。

### 2. 动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）

- 600 $\mu$ l 冰预冷的细胞核裂解液加入 10–20mg 新鲜或者解冻的组织用小匀浆器匀浆 10 秒钟，将裂解物转入 1.5ml 小离心管。另一种方法是用在液氮中研磨组织成细粉后，取 10–20mg 组织（植物叶片可以适当多加如用 40mg）转入装有 600 $\mu$ l 冰预冷的细胞核裂解液的 1.5ml 离心管，用大口径枪头吹打混匀。
- 将裂解物放置在 65 $^{\circ}$ C 水浴 15–30 分钟。
- 接步骤 4 继续。

### 3. 动物组织（鼠尾）

- 处理样品前，先加入 120 $\mu$ l 0.5M EDTA (PH8.0) 到装有 500 $\mu$ l 细胞核裂解液的 1.5ml 离心管中，混匀后冰预冷备用

b. 将鼠尾在液氮中研磨成细粉或者将 0.5–1.0cm 的鼠尾巴尖（一定要剪 0–2cm 范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好）剪碎放入一个 1.5ml 离心管后，加入 600 $\mu$ l 上面配好的 EDTA/细胞核裂解液。

c. 加入 17.5 $\mu$ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)，颠倒混匀。

d. 55 $^{\circ}$ C 水浴放置过夜，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。或者在一个摇床上 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时，每一个小时，高速涡旋振荡混匀一次。确保鼠尾裂解完全（剪碎的可能不能完全裂解，产量会低一些）。

4. 加入 RNase A (10mg/ml) 1.8 $\mu$ l 至裂解物中至终浓度 30 $\mu$ g/ml，颠倒混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 15–30 分钟去除残留 RNA。然后室温冷却至少 5 分钟或者冰浴使回复到室温。

5. 在回复到室温的裂解物内加入 200 $\mu$ l 蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴 5 分钟。

由于样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA，如果用手振荡混匀，则不可以用手上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA，但是力度也不能太小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开，离心的时候会与蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分，最后的产物污染有大量的蛋白质。因此建议新手还是用涡旋振荡器。

6. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

7. 小心缓慢吸取上清到一个新的 1.5ml 离心管中，不要吸动沉淀。

吸取上清时小心不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀，如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 2 分钟后取上清。

8. 加入等体积的室温异丙醇（约 600 $\mu$ l），颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

**注意**有时候棉絮状（丝状）DNA 颠倒混匀的时候，粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 9，直接 12，000rpm 离心 1 分钟，弃上清，然后接步骤 11。

9. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。

**如果**棉絮状（丝状）DNA 沉淀附着有气泡，则会漂浮在液体表面，而不会沉淀下来，要小心避开沉淀吸取上清，不要把沉淀给吸掉了。

10. 加入 1ml70%乙醇后，颠倒漂洗 DNA 沉淀，12, 000rpm 离心 1 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

11. 加入 0.5ml70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，12, 000rpm 离心 1 分钟，倒去上清（注意不要把 DNA 沉淀倒掉了），倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇，还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

**注意**不要干燥过头，否则 DNA 极其难溶，也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

12. 加入 100 $\mu$ lDNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟（不要超过一小时），中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA。

13. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在-20 $^{\circ}$ C。

## 二、原理简介

本试剂盒用于快速的从动植物细胞/组织中提取基因组 DNA。样品研磨或者匀浆后加入细胞核裂解液，首先在强去污剂或者和蛋白酶 K 协同作用下裂解细胞释放出基因组 DNA，接着加入 RNase A 去除 RNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

## 三、试剂盒特点

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂。
2. 快速，简捷，组织样品操作整个过程可在 1 个小时内完成。
3. 结果稳定，产量高（比离心柱型的产量高一倍以上），OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 50Kb-150kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应以及文库构建。

## 四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13, 000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 用户需自备异丙醇、70%乙醇、PBS(用于细胞)、液氮研钵/或匀浆器(用于组织)、0.5mol EDTA 和蛋白酶 K(用于鼠尾)、水浴箱。
3. 开始实验前将需要的水浴先预热好备用。
4. 本试剂盒为溶液型，可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的组织细胞量，请联系我们索取其它处理量的操作手册。