

- 加入 500 $\mu$ l 抑制物去除液 IR, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃废液。
- 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热), 室温放置 3-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱 AC 中, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 50 $\mu$ l, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。

- 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。

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

| 出现的问题   | 可能的原因              | 建议解决方法   |
|---------|--------------------|--|
| DNA 产量低 | 组织块太大, 蛋白酶 K 消化不完全 | 液氮研磨或者尽量将组织切成小块, 或者延长蛋白酶 K 消化时间至过夜或者在原有消化基础上另加 20 $\mu$ l 蛋白酶 K 消化 1-2 小时。     |
|         | 蛋白酶 K 失效了          | 收到蛋白酶 K 后, 按照每次使用量分装冻存, 避免反复冻融。  |
|         | 裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀  | 加入结合液后, 和加入蛋白酶 K 后立即 <b>剧烈颠倒轻摇混匀</b> 。<br>加入异丙醇后应该和裂解物 <b>剧烈颠倒轻摇混匀</b> 才加入吸附柱。 |

## 二、原理简介

独特的结合液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶, 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物, 蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

## 三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
- 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
- 多次柱漂洗确保高纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 典型的比值达 1.7~1.9, 长度可达 30Kb-50kb, 可直接用于 PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

## 四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

- 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。
- 开始实验前将需要的水浴先预热到 70 $^{\circ}$ C 备用。
- 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇!

### 1. 组织培养细胞

- 收集约  $10^5$ - $10^6$  悬浮细胞到一个 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 10-20 $\mu$ l 残留的液体。
- 加 200 $\mu$ l 缓冲液 TB 重悬洗涤细胞，重复上述步骤 1b，弃上清后将细胞重悬于 200 $\mu$ l 缓冲液 TB 中。
- 加入 200 $\mu$ l 结合液 CB，立刻**剧烈颠倒轻摇充分混匀**，再加入 20 $\mu$ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液，充分混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。
- 冷却后加入 100 $\mu$ l 异丙醇，**颠倒轻摇充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。
- 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 10, 000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
- 接步骤 4 继续。

### 2. 动植物组织 (例如鼠肝脑或者植物叶片)

- 将新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块 (切成小块可以提高产量) 或者在液氮中研磨组织成细粉后，取 20-50mg 组织细粉转入装有 200 $\mu$ l 组织裂解液 TL 的 1.5ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。
- 加入 20 $\mu$ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)，**剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
- 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

- 加入 200 $\mu$ l 结合液 CB，**剧烈颠倒轻摇充分混匀**，70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟。
- 冷却后加入 100 $\mu$ l 异丙醇，**剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
- 用 1ml 的枪头吸取部分上述混合物，可能有不溶组织物进入并堵住枪头，可将枪头在吸水纸上轻蹭去除不溶物，如果吸上来的混合物少则可以将枪头和不溶物一起弃去，该步骤是为了去除不溶物，以免下面不溶物堵塞离心柱。
- 将上一步剩余混合物加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 10, 000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
- 接步骤 4 继续。

### 3. 动物组织 (鼠尾)

- 将鼠尾在液氮中研磨成细粉取 20-50mg 细粉或者将 0.2-0.5cm (20-50mg) 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) 剪碎后放入一个 1.5ml 离心管后，加入 200 $\mu$ l 组织裂解液 TL，用大口径枪头吹打混匀。
- 加入 20 $\mu$ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)，**剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
- 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。
- 用一个 1ml **不带针头** 的一次性输液器抽打裂解物 2-3 次。
- 加入 200 $\mu$ l 结合液 CB 和 100 $\mu$ l 异丙醇，**剧烈颠倒轻摇充分混匀**。
- 13, 000 rpm 离心 5 分钟，将上清加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管中) 10, 000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
- 接步骤 4 继续。

上述步骤中适当力度充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。