



## 动物细胞基因组 DNA 提取试剂盒

产品编号: NEP002-2

产品规格: 100T

### 产品简介:

本试剂盒适用于动物细胞基因组 DNA 的提取。细胞被裂解和蛋白酶 K 消化后, DNA 被释放出来, 在高盐的条件下, 硅基质膜的柱子特异的吸附 DNA, 在低盐高 pH 值条件下, 被吸附的 DNA 被洗脱下来。提取的基因组 DNA 可以直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

### 组成:

成分	100 次	注意事项
RNase A	2 ml	-20℃ 保存
Proteinase K	1 ml	-20℃ 保存
Lysis Buffer	80 ml	室温低可能有沉淀, 50℃ 加热溶解
Wash buffer A	54 ml	用前加入 36 ml 无水乙醇, 充分混匀
Wash buffer B	16 ml×2	用前加入 64ml 无水乙醇, 充分混匀
TE buffer	10 ml	
离心柱	100 个	单个最大吸附量 20 μg

### 实验前试剂准备

Wash buffer A 中加入 18 ml 无水乙醇, 充分混匀。

Wash buffer B 为两瓶, 均为 16ml, 分别加入 64 ml 无水乙醇, 充分混匀。

### 储存条件:

本试剂盒使用后, 请按照说明书组成注意事项中条件保存, 未说明一律 4℃ 保存。

### 步骤:

#### 1. 样品预处理:

**动物悬浮细胞:** a、室温下 12,000 rpm 离心 1 min 收集细胞; b、吸出培养基将细胞重悬于预冷的 0.01M 的 PBS 中; c、12,000 rpm 离心 1 min, 弃去 PBS。

**动物单层培养细胞:** a、吸出培养基, 用预冷的 0.01M 的 PBS 洗一次; b、12,000rpm 离心 1min, 弃去 PBS。

**动物贴壁培养细胞:** 用预冷的 0.01M 的 PBS 吹打成细胞悬液, 12,000rpm 离心 1min 弃去 PBS。按每  $1\sim 5\times 10^6$  细胞加入 600 μl Lysis Buffer 使用。

2. 加入 600 μl 的 Lysis Buffer, 颠倒充分混匀。如需消化 RNA, 可加入 20 μl RNase A, 混匀, 室温放置 5 min。

3. 加入 10 μl Proteinase K, 混匀。56℃ 水浴 45 min-1 h, 其间颠倒混匀数次直到看到组织完全裂解, 裂解完全的标准为液体变得清亮及粘稠。(此步骤可以过夜处理)



- 12,000 rpm 离心 10 min, 将上清转入新的离心管中, 加入 800  $\mu$ l 无水乙醇, 混匀。
- 将液体转入离心柱 (一次加不完, 可分次转入), 12,000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- 加入 700  $\mu$ l Wash buffer A (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 s -1 min, 弃废液。
- 加入 700  $\mu$ l Wash buffer B (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 s -1 min, 弃废液。
- 加入 500  $\mu$ l Wash buffer B, 12,000 rpm 离心 30 s-1 min, 弃废液。
- 再次 12,000 rpm 离心 2 min, 将离心柱置于新的离心管中, 并打开离心柱盖, 于室温或 37 $^{\circ}$ C 恒温箱放置 5~10 min 直至无明显乙醇味。
- 在硅基质膜中央加入 50-200  $\mu$ l TE buffer(事先预热 55-65 $^{\circ}$ C), 置于室温 2-5 min, 12,000 rpm 离心 2min。
- 离心得到的溶液再次加入离心柱中, 室温放置 2min, 12,000 rpm 离心 2 min。所得的溶液为纯化后的基因组 DNA。

#### 纯化效果检测:

取 2-5 $\mu$ l 得到的 DNA 产物, 0.7% agarose 电泳检测 DNA 分子的完整性和紫外分光光度计检测浓度和纯度。

DNA 在 260nm 处有吸收峰, 检测时应该使 OD<sub>260</sub> 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD<sub>260</sub> 为 1 时大概相当于 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA, 40 $\mu$ g/ml 单链 DNA。

核酸浓度 ( $\mu$ g/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 × 稀释倍数。

OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值应该为 1.7~2.0。

#### 常见问题分析:

常见问题	可能原因	建议
堵柱子	裂解消化不充分	延长 Proteinase K 消化时间, 可过夜消化
	样品过多	样品量不要超过说明书所定最大量; 可适当增加 Lysis Buffer 和 Proteinase K 的量
DNA 产量低	柱子堵塞	按上述方法解决
	Wash buffer A、Wash buffer B 没有加无水乙醇	按说明书加入无水乙醇
	洗脱效率低	洗脱液使用前于 55-65 $^{\circ}$ C 预热; 洗脱液 pH 值不合适, 应保证在 7.5~8.5
	样品裂解不完全	适当延长裂解时间, 可过夜消化
样品不够新鲜	尽量使用新鲜样品	
DNA 纯度低	消化不完全	样品量不要超过规定范围; 延长消化时间, 使样品充分消化;
	洗涤不当	严格按照说明书步骤洗脱
	乙醇未除干净	适当延长晾干时间, 使乙醇充分挥发。