

Universal Genomic DNA Kit (Proteinase K)

通用型基因组 DNA 提取试剂盒（蛋白酶 K）

目录号：DNE29

试剂盒组成

| Component | DNE29-01 (50 preps) | DNE29-02 (100 preps) |
|------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Buffer SL | 15 ml | 25 ml |
| Buffer VL | 15 ml | 25 ml |
| Buffer WB1 | 25 ml | 50 ml |
| Buffer WB2(concentration) | 13 ml | 25 ml |
| Buffer EB | 10 ml | 20 ml |
| 10× Buffer RCL | 15 ml | 30 ml |
| ● Proteinase K (20 mg/ml) | 1 ml | 1 ml x 2 |
| ● RNase A (10 mg/ml) | 200 μl | 400 μl |
| Spin Columns AC with Collection Tubes | 50 | 100 |

保存方法

室温（15-30°C）保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。



产品介绍

本试剂盒适合从血液、动物培养细胞、多种动物组织和培养细菌中提取基因组 DNA，纯化过程无需苯酚/氯仿等有机试剂。采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他杂质可流过膜，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

提取得率

| 样本材料 | 提取量 | 总 DNA 量 |
|----------|-----------------------|--------------|
| 哺乳动物全血 | 100-400 μ l | 3-10 μ g |
| 禽类、两栖类全血 | 5-20 μ l | 5-40 μ g |
| 细胞培养液 | 10^6 - 10^7 cells | 5-30 μ g |
| 动物组织 | 30 mg | 2-30 μ g |
| 细菌培养液 | 10^6 - 10^8 cells | 5-30 μ g |
| 精液 | 100 μ l | 2-5 μ g |

自备试剂

无水乙醇；**1 M DTT 溶液**（提取精子 DNA 时须准备）；**溶菌酶缓冲液**（提取革兰氏阳性菌时须准备），配制方法：将溶菌酶溶解在 TE 缓冲液中（10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA, PH8.0），使溶菌酶浓度为 20 mg/ml。

注意事项

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
2. 储存温度低时若缓冲液 SL 或 VL 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
3. **第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，混匀后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！**

操作步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

1. 样本前处理

动物组织

- a) 动物组织 5-30 mg 剪成小碎块（或打碎成细胞悬液）放入 1.5 ml 离心管，加入 200 μ l Buffer SL 和 20 μ l Proteinase K（20 mg/ml），振荡混匀，56°C 水浴直至组织消化溶解，进行步骤 2。

注意：1) 提取的组织不同，起始量也稍有不同，脾脏组织用量应少于 10 mg，鼠尾取 0.2-0.5 cm 的尾巴尖。2) 不同组织裂解时间不同，通常 1-3 h 即可完成，每小时涡旋混匀样品 2-3 次（必要时可以消化过夜，不会影响后续操作）。

血液及培养细胞

a) **无核红细胞抗凝血（哺乳类动物）**：当血液体积 $< 200 \mu\text{l}$ 时，直接加入 Buffer SL 补足至 $200 \mu\text{l}$ ；当体积为 $0.2\text{-}1\text{ ml}$ 时，加入两倍体积红细胞裂解液 Buffer RCL（试剂盒提供的 Buffer RCL 为 $10\times$ ，使用前用去离子水稀释至 $1\times$ ），颠倒混匀 10 次， $12,000\text{ rpm}$ （ $\sim 13,400\times g$ ）离心 1 min，倒弃红色上清，留下管底细胞核沉淀（如果沉淀仍为红色，可重复裂解一次），加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer SL，剧烈振荡充分裂解细胞核。

有核红细胞抗凝血（禽类、鸟类、两栖类等）：无需去除红细胞，直接取 $5\text{-}10 \mu\text{l}$ 抗凝血，加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer SL。

贴壁培养细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5×10^6 个细胞）， $10,000\text{ rpm}$ （ $\sim 11,200\times g$ ）离心 1 min，弃尽上清，留下细胞沉淀，加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer SL，振荡至彻底悬浮；

b) 加入 $20 \mu\text{l}$ Proteinase K（ 20 mg/ml ），涡旋振荡混匀进行步骤 2。

细菌

a) 取 $0.5\text{-}2\text{ ml}$ 菌液（菌量不超过 2×10^9 个）， $10,000\text{ rpm}$ （ $\sim 11,500\times g$ ）离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集细菌沉淀。

b) **革兰氏阴性菌**：向菌体沉淀中加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer SL，振荡至菌体彻底悬浮。

革兰氏阳性菌：先进行溶菌酶破壁处理（如不确定为何种菌属，请按处理革兰氏阳性菌的方法进行）。向菌体沉淀中加入 $200 \mu\text{l}$ 溶菌酶缓冲液（配制方法见自备试剂）， 37°C 温育 $30\text{-}60\text{ min}$ ， $12,000\text{ rpm}$ （ $\sim 13,400\times g$ ）离心 2 min，弃上清后向沉淀中加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer SL，振荡至菌体彻底悬浮。

c) 加入 $20 \mu\text{l}$ Proteinase K（ 25 mg/ml ）溶液，涡旋振荡混匀进行步骤 2。

精液

a) 取 $100 \mu\text{l}$ 精液，加入 Buffer SL 补足至 $200 \mu\text{l}$ 。

b) 加入 $20 \mu\text{l}$ Proteinase K（ 25 mg/ml ）和 $20 \mu\text{l}$ DTT（ 1 M ），涡旋振荡 15 s 混匀， 56°C 孵育 6 h（最低不少于 5 h，最长不超过 12 h），期间每隔 30 min 涡旋混匀一次。

c) 孵育完成后进行步骤 3。

2. **可选步骤**：如果需要去除 RNA，可加入 $4 \mu\text{l}$ RNase A（ 10 mg/ml ）溶液，涡旋混匀，室温放置 5 min。

3. 加入 $220 \mu\text{l}$ Buffer VL，涡旋振荡混匀， 70°C 水浴 10 min，水浴后溶液应变清亮。

4. **可选步骤**： $12,000\text{ rpm}$ （ $\sim 13,400\times g$ ）离心 2 min，以除掉不能消化的类似于纤维/毛发/骨骼等杂质，防止柱子堵塞，进一步提高纯度。将上清转移到一个新的离心管中，不要吸到沉淀杂质。

5. 向上一步的溶液中加入 $220 \mu\text{l}$ 无水乙醇，涡旋混匀（此时可能会出现絮状沉淀，属于正常现象），将得到的溶液和可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin

Columns AC) 中。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。

6. 向吸附柱 AC 中加入 **500 μ l Buffer WB1**, 12,000 rpm 离心 30 s, 倒掉废液。
7. 向吸附柱 AC 中加入 **600 μ l Buffer WB2** (使用前请检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 倒掉废液。
8. 重复步骤 7。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管和废液。
注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会降低洗脱效率, 影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
10. 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 **50-100 μ l Buffer EB 或灭菌水**, 室温放置 3-5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液。-20°C 保存 DNA。
注意: 1) Buffer EB 在 56°C 中预热可以增加产量。也可用无菌水洗脱, 但应确保其 PH 在 7.0-8.5 范围内。
2) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可以使用小于 100 μ l EB 洗脱, 也可以将步骤 10 所得的 DNA 溶液重新加至吸附膜上, 再次离心洗脱。如果预期 DNA 的量小于 1 μ g, 推荐用 50 μ l Buffer EB 进行洗脱。