



ELK Biotechnology
For research use only.

Blood/Cell/Tissue Genomic DNA Extraction Kit

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书

货号	规格	储藏/有效期
EP007-50T	50T	室温/一年
EP007-200T	200T	室温/一年

产品介绍

本试剂盒适合于从新鲜或冷冻的动物组织、细胞、血液、细菌等多种样品中提取高纯度总 DNA。本品可纯化获得分子量最大为 50 kb 的 DNA 片段，纯化过程不需使用苯酚或氯仿等有毒溶剂，无需乙醇沉淀。本试剂盒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，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可得到高纯度 DNA。纯化得到 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。

试剂盒组成

成分	EP007-50T	EP007-200T	Storage
Proteinase K	1ml	4ml	-20°C
Solution GA1	15 ml	60 ml	RT
Solution GS	15 ml	60 ml	RT
Solution GA2	25 ml	100 ml	RT
Wash Buffer	30 ml	120 ml	RT
Solution RP	60 ml	240 ml	RT
Solution GE	15 ml	60 ml	RT
吸附柱 G 柱	50 套	200 套	RT
说明书	1 份	1 份	RT

一、使用前准备

Wash Buffer 和 Solution RP: 使用前请将适量无水乙醇加入 **Wash Buffer 和 Solution RP** (试剂瓶上有标签提示) 中。

Enzymatic Lysis Buffer (提取革兰氏阳性菌基因组 DNA 时须准备,也可以购买我公司该产品) 。



ELK Biotechnology

For research use only.

重要注意事项:

1. 样品应避免反复冻融, 否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
2. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组, 建议在对数生长期早期收集样品。
3. 第一次使用前应按试剂瓶标签的说明在 Wash Buffer 和 Solution RP 中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查 Solution GA1、Solution GS、Solution GA2 是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀, 请将 Solution GA1、Solution GS、Solution GA2 于 37 °C 水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对 RNA 污染比较敏感, 可以在加入 Solution GA2 前加入 20 μL DNase-Free 的 RNase A (20 mg/ml), RNase A 本试剂盒并未提供, 如需要可单独向本公司订购。

二、 操作步骤

1. 样品处理

- a. 提取 200 μL 血液样品时, 向离心管 (自备) 中加入样本后, 可直接进行下一步实验;

注: 如需处理更大体积血液, 如 300 μL-1 ml, 应按以下步骤操作: 在样品中加入 3 倍体积红细胞裂解液 (例如, 300 μL 血液加入 900 μL 红细胞裂解液), 颠倒混匀, 室温放置 5 min, 期间再颠倒混匀几次. 10000 rpm (~11,500×g) 离心 1 min (若离心机最高转速不允许, 可 3000 rpm (~3,400×g) 离心 5 min), 吸去上清, 留下白细胞沉淀, 加 200 μL Solution GA1, 振荡至彻底混匀; 当血液样本量小于 200 μL 时, 加入 Solution GA1 补足至 200 μL, 再进行下一步实验;

- b. 如果处理血液样本为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血, 其红细胞为有核细胞, 血液样本量为 5-20 μL, 可加入 Solution GA1, 补足至 200 μL 后进行后续实验;

- c. 提取 (2×10^7 个左右) 细胞的样品时, 离心收集细胞后, 用 200 μL Solution GA1 重悬细胞, 即可进行下一步操作;

- d. 处理样本为动物组织时, 液氮研磨充分后迅速加入 200 μL Solution GA1, 重悬充分后 (可适当研磨), 即可进行下一步操作。

- e. 当处理样本为 1-30 ml 细菌时, 向离心管 (自备) 中加入样本后, 离心, 收集沉淀, 用 200 μL Solution GA1 重悬。

注: 如果下游试验对 RNA 敏感, 可加入 4 μL RNase A (100 mg/ml) 溶液, 震荡 15 sec, 室温放置 2 min。

2. 向以上溶液中加入 20 μL Proteinase K, 混匀。

3. 加入 200 μL Solution GS, 加入处理样品后, 振荡混匀, 轻甩离心, 以离下附着在管壁的残留液体。56 °C 温浴 10 min。若为组织等消化较为困难的样本, 可考虑消化时间加长到 1-3 h, 甚至过夜消化。

注: 消化完成后, 管内溶液应当是清澈透明, 若没有达到清澈透明, 建议处理时间延长至透明, 或离心后小心吸取上部分透明溶液, 但这样会有较多的 DNA 损失!

4. **(选做)** 如上一步的消化不彻底, 可能在后续操作中造成吸附柱堵塞, 在此步可在 4 °C 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 1 min, 小心吸取上清到一干净的 EP 管中, 然后进行下一步操作。

5. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入 350 μL GA2, 涡旋震荡充分混匀。加入 350 μL 无水乙醇,



ELK Biotechnology For research use only.

充分震荡均匀，短暂离心（轻甩下管壁水珠即可）。

注：1) 加入Solution GA2后要立即混匀。

2) 加入Solution GA2后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织在加入Solution GA2后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。

6. 将上一步得到的混合液添加至本试剂盒提供的吸附柱 G 柱中（如一次无法加完，可分多次加入），12,000 rpm ($\approx 13,400 \times g$) 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

7. 向吸附柱中加入 500 μL Solution RP（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤7.。

8. 向吸附柱中加入 600 μL Wash Buffer（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 12,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

10. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 50-200 μL Solution GE 或灭菌水，室温放置 2-5 min，12,000 rpm 离心 1 min，收集 DNA 溶液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 DNA。

注：1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。

2) Solution GE 在 65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，离心之前室温孵育 5 min 可以增加产量；用另外的 50-200 μL Solution GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

3) 如果要提高 DNA 的终浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置 2-5 min，12,000 rpm 离心 1min；若洗脱体积小于 200 μL ，可以增加 DNA 的终浓度，但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μg ，推荐用 50 μL Solution GE 或灭菌水洗脱。

4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用 Solution GE 洗脱并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

三、DNA 浓度及纯度检测

得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链 DNA、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 单链 DNA。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。



ELK Biotechnology

For research use only.

四、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. 若 Solution GA1、 Solution GS 、 Solution GA2 中有沉淀，可在 56 °C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
3. 所有离心步骤均为使用台式离心机，室温下离心。

五、常见问题及解答

A、堵柱子：

建议：请将样本裂解充分,无明显絮状物后,进行下一步操作;用 Solution RP 多次清洗(注意,多次清洗会造成基因组回收率低);一次性针头滤器或 200 孔筛网过滤。

B、基因组提取得率低：

建议：延长消化时间,增加样本用量等。

C、Solution 中有沉淀未溶解

建议：Solution 在温度较低时会出现沉淀，使用前请检查是否有沉淀生成，如有沉淀生成，请置于 37 °C 温育片刻，待溶液澄清后使用。

D、Wash Buffer 中未按要求加入乙醇

建议：按照说明书要求加入要求量的无水乙醇，使用后旋紧瓶盖，防止乙醇挥发。

E、溶解体积及时间的选择

建议：溶解体积将会影响最终的收获量，溶解体积越大，收获量越高，但是浓度将会降低。请使用试剂盒推荐的溶解体积进行溶解，以保证最好的收获量和浓度。建议：加入 Solution GE 后，室温放置 2~5 min，更有利于溶解。