

## Universal DNA Extraction Micro Kit

### 通用型 DNA 微量提取试剂盒

本产品适合于从 1~10mg 动物组织和小于  $5 \times 10^5$  培养细胞样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

### 产品组份

产品编号	DNU332-01	DNU332-02	DNU332-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
DNA Extraction Micro Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer TL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer MBL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2A	5 ml	20 ml	2 x 30 ml
RNase Solution	60 $\mu$ l	300 $\mu$ l	1.4 ml
Proteinase K	220 $\mu$ l	1.1 ml	5.5 ml
Carrier RNA	1	1	1
Buffer EB	1.5 ml	10 ml	60 ml

### 保存条件

本产品除 RNase Solution 及 carrier RNA 外,可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月,长期保存时需置于 2-8 $^{\circ}$ C。低温下, Buffer TL 可能会有沉淀形成,需 55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 和 carrier RNA 室温运输,收到产品后请保存于 -20~8 $^{\circ}$ C。

## 准备事项

- 水浴锅
- Carrier RNA 使用前，加入 550 $\mu$ l Buffer EB 稀释。
- Buffer W1A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

### A. 动物组织的消化裂解(1~10mg)

1. 把 1~10mg 组织剪成尽量小的碎片，转移至 1.5ml 离心管中。加入 220 $\mu$ l Buffer TL 和 20 $\mu$ l Proteinase K，涡旋混匀。55 $^{\circ}$ C 温浴 1~3 小时或过夜消化，期间颠倒混匀几次或振荡温浴。

若要彻底去除 RNA，加入 3 $\mu$ l RNase Solution，室温放置 15 分钟。若样品量 $\leq$ 1mg，建议加入 2 $\mu$ l carrier RNA。

2. 加入 250 $\mu$ l Buffer MBL 至消化液中，高速涡旋 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
3. (可选：有未消化物质)13,000 x g 离心 3 分钟，转移上清至新的 1.5ml 离心管中。按第 4 步进行操作。

### B. 培养细胞的消化裂解(5 x 10<sup>5</sup>)

1. 计算细胞数量。2,000 x g 离心 5 分钟收集细胞，小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 220 $\mu$ l Buffer TL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中。涡旋 10 秒重悬细胞。55 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟。

若要彻底去除 RNA，加入 3 $\mu$ l RNase Solution，室温放置 15 分钟。

3. 加入 250 $\mu$ l Buffer MBL 至细胞重悬液中，涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。按第 4 步进行操作。

### C. 液体样品(拭子保存液样品、唾液、胸水等)

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K。
2. 加入 1~100 $\mu$ l 唾液、抗凝血液等样品，用 pbs 稀释至 230 $\mu$ l，涡旋 15 秒混匀。

若样品量 $\leq$ 10 $\mu$ l，建议加入 2 $\mu$ l carrier RNA。

3. 加入 250 $\mu$ l Buffer MBL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。按第 4 步进行操作。

#### **D. 血片、干拭子样品**

1. 转移拭子或干血斑样品到 1.5ml 离心管中，加入 320 $\mu$ l Buffer TL 和 20 $\mu$ l Proteinase K，涡旋混匀。55 $^{\circ}$ C 振荡温浴 30 分钟，若无振荡温浴，期间颠倒混匀数次。
2. 13,000 $\times$ g 离心 1 分钟，转移 250 $\mu$ l 上清液至新的离心管中。
3. 加入 250 $\mu$ l Buffer MBL，涡旋混匀，70 $^{\circ}$ C 振荡温浴 10 分钟。按第 4 步进行操作。

#### **过柱纯化**

4. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。
5. 把 DNA Extraction Micro Columns 装在 2ml 收集管中。转移第 4 步获得的混合液至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
若柱子出现堵塞，14,000  $\times$  g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 $\mu$ l，分次过柱。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 20 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 15~50 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。  
柱子最小的洗脱体积是 15 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量。富含核酸样品如肝脏、脾脏、肺脏，用量不要超过 10mg。
- **样品消化不充分：**用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **样品裂解不充分：**样品与 Buffer MBL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer MBL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer MBL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 13,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分：**延长消化时间让样品充分消化，用玻璃匀浆器对组织样品进行匀浆。
- Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。