



Universal Genomic DNA Kit

通用型柱式基因组提取试剂盒

目录号：CW2298S (50 preps)
CW2298M (200 preps)

保存条件：室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW2298S 50 preps	CW2298M 200 preps
Buffer GTL	15 mL	60 mL
Buffer GL	15 mL	50 mL
Buffer GW1 (concentrate)	13 mL	52 mL
Buffer GW2 (concentrate)	15 mL	70 mL
Buffer GE	15 mL	60 mL
Proteinase K	1.25 mL	4×1.25 mL
Spin Columns DM with Collection Tubes	50	200

产品简介

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。纯化得到的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。

自备试剂

1. 无水乙醇
2. Enzymatic Lysis Buffer (提取革兰氏阳性菌基因组DNA时须准备)。
Enzymatic Lysis Buffer配方: 20 mM Tris, pH8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100; 终浓度为20 mg/mL的Lysozyme (溶菌酶)。

实验前准备及重要注意事项

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Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查Buffer GTL和Buffer GL是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer GL和Buffer GTL于56°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Buffer GL前加入4 μL DNase-Free的RNase A (100 mg/mL)，RNase A 本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0601S。

操作步骤

i 血液及细胞样本基因组提取

1. 材料处理

- 1a. 如果提取材料为哺乳动物抗凝血液(无核红细胞),可直接向50-200 μL 新鲜或冷冻的抗凝血液样品中加入Buffer GTL补足至200 μL ;
- 1b. 如果提取材料为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液,其红细胞为有核细胞,取5-10 μL 新鲜或冷冻的抗凝血液样品,加入Buffer GTL补足至200 μL ;
- 1c. 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液(最大提取量为 5×10^6 个细胞), 2,000 rpm (400 \times g)离心5分钟,弃尽上清,加200 μL GTL,振荡至样品彻底悬浮;

注意: 如需去除RNA,可在上述步骤完成后,加入4 μL 浓度为100 mg/mL的RNase A溶液(货号: CW0601S),涡旋15秒,室温放置2分钟。

2. 加入20 μL Proteinase K。

3. 加入200 μL Buffer GL, 涡旋震荡充分混匀, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟。

4. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入200 μL 无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。短暂离心。

注意: 1) 加入Buffer GL和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。

2) 加入Buffer GL和无水乙醇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Buffer GL和无水乙醇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。

5. 上一个步骤中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中,若一次不能加完溶液,可分多次转入。12,000 rpm (~13,400 \times g)离心1分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟,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 Buffer GW2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度,可重复步骤7。

8. 12,000 rpm离心2分钟,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,乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

9. 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 Buffer GE或灭菌水,室温放置2-5分钟,12,000 rpm离心1分钟,收集DNA溶液, -20°C 保存DNA。
- 注意: 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) Buffer GE在 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴预热,离心之前室温孵育5分钟可以增加产量;用另外的50-200 μL Buffer 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分钟,12,000rpm离心1分钟;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 Buffer 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Buffer GE洗脱并于 -20°C 保存。

ii 动物组织基因组提取

1. 材料处理

如果提取材料为动物组织,取25 mg(脾组织用量应少于10 mg);如果材料为鼠尾,取一段长度为0.4-0.6 cm的大鼠鼠尾或两段长度为0.4-0.6 cm的小鼠鼠尾。

- 1a. 样本进行液氮研磨或切成小块后置于1.5 mL离心管中,加入180 μL Buffer GTL,将不同样品做好标记。
- 1b. 若使用匀浆器处理样本,匀浆前向样本中加入不超过80 μL Buffer GTL,匀浆后加入100 μL Buffer GTL。

注意: 1) 确保各组织的量不要超出推荐范围。

2) 组织样本在加入Buffer GTL之前用液氮研磨或加入Buffer GTL用匀浆器匀浆处理,可以增加裂解效率。

2. 加入20 μL Proteinase K,涡旋震荡使样品彻底混匀。 56°C 水浴,直至组织完全裂解,孵育过程中可每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样品分散。

注意: 1) 不同组织消化时间不同,通常1-3小时即可完成,鼠尾需要消化6-8小时,必要时过夜消化,不会影响后续操作。

2) 如果孵育和涡旋震荡后仍然有胶状物质,延长 56°C 孵育时间或再加入20 μL Proteinase K消化。

3) 如需去除RNA,可在上述步骤完成后,加入4 μL 的浓度为100 mg/mL的RNase A溶液(货号: CW0601S),涡旋15秒,室温放置5-10分钟。

3. 加入200 μL Buffer GL, 涡旋震荡充分混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟。短暂离心后加入200 μL 无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。

注意: 1) 加入Buffer GL和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。

2) 加入Buffer GL和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。一些组织(如脾, 肺)在加入Buffer GL和无水乙醇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。

4. 短暂离心, 将步骤3所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm (~13,400 $\times g$) 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤6。

7. 12,000 rpm离心2分钟, 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, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

8. 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 Buffer GE或灭菌水, 室温放置2-5分钟, 12,000 rpm离心1分钟, 收集DNA溶液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。

注意: 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) Buffer GE在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热, 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量; 用另外的50-200 μL Buffer 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分钟, 12,000 rpm离心1分钟; 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 Buffer 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Buffer GE洗脱并于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

iii 细菌基因组提取

1. 细菌样本预处理

1a. 革兰氏阴性菌

(1) 取细菌培养物1-5 mL (10^6 - 10^8 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管(自备)中, 12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心1分钟, 尽量吸净上清。

(2) 向沉淀中加入180 μL Buffer GTL, 振荡使菌体重悬。

(3) 加入20 μL Proteinase K, 涡旋混匀, 56°C孵育, 直至菌体完全裂解, 孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

注意: 如需去除RNA, 可在上述步骤完成后, 加入4 μL浓度为100 mg/mL的RNase A溶液(货号: CW0601S), 震荡混匀, 室温放置5-10分钟。

(4) 加入200 μL Buffer GL, 涡旋震荡混匀。

1b. 革兰氏阳性菌

(1) 取细菌培养物1-5 mL (10^6 - 10^8 个细胞, 最多不超过 2×10^9 个细胞) 置于离心管(自备)中, 12,000 rpm离心1分钟, 尽量吸净上清。

(2) 加入180 μL Enzymatic Lysis Buffer(自备)使菌体重悬。

(3) 37°C孵育30分钟。

(4) 加入20 μL Proteinase K涡旋震荡, 充分混匀。加入200 μL Buffer GL, 涡旋震荡混匀。56°C孵育30分钟。

注意: 1) 如果需要, 95°C孵育15分钟可以使病原体失活, 但是95°C孵育会造成一些DNA的降解。

2) 如需去除RNA, 可在上述步骤完成后, 加入4μL浓度为100 mg/mL的RNase A溶液(货号: CW0601S), 震荡混匀, 室温放置5-10分钟。

2. 加入200 μL无水乙醇, 涡旋震荡充分混匀。

注意: 加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

3. 将步骤2所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入到已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

4. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤5。

6. 12,000 rpm离心2分钟, 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, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)。

7. 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 Buffer GE或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液， -20°C 保存DNA。
- 注意：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) Buffer GE在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热，离心之前室温孵育5分钟可以增加产量；用另外的50-200 μL Buffer 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分钟，12,000 rpm离心1分钟；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 Buffer 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Buffer GE洗脱并于 -20°C 保存。