

Code No. 9765

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Universal
Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 实验前的准备	1
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 洗脱体积对 DNA 提取量和浓度的影响	5
● 洗脱次数对 DNA 提取量的影响	5
● 注意事项	6
● 不同材料的 DNA 提取量	6
● 实验材料最大起始量	7
● Q&A	7

● 制品说明

本试剂盒是用于提取血液、革兰氏阴性细菌、培养细胞及植物组织（植物幼嫩的叶、茎、根等）、动物组织（Blood/Gram-negative Bacteria/Cultured Cells/Plant Tissue/Animal Tissue）等基因组 DNA 的广谱型小量纯化试剂盒。试剂盒采用了特别的细胞裂解系统，由细胞裂解液裂解细胞释放基因组 DNA，再结合 DNA 制备膜技术纯化基因组 DNA。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，组织细胞裂解后，提取操作仅需 20 分钟便可完成。使用本试剂盒可从 50~100 μ l 的哺乳动物全血（含抗凝剂）、1~10 μ l 的有核红细胞全血（含抗凝剂）、 $1.0\sim 5.0E+09$ 的革兰氏阴性细菌、 $1.0E+05\sim 1.0E+07$ 的培养细胞、2~25 mg 的动物组织、10~25 mg 深加工品或 25~100 mg 幼嫩植物组织中纯化得到多至数十微克的高纯度基因组 DNA，提取得到的基因组 DNA 可用于 PCR 反应、Southern 杂交以及 RAPD、AFLP、RFLP 等多种分子生物学实验。

● 制品内容（50 次量）

本试剂盒分试剂 Part I 与 Part II 两部分。

■ Part I -20℃保存

Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
RNase A (10 mg/ml)	0.5 ml

■ Part II 室温（15-25℃）保存

Buffer GL*1	12 ml
Buffer GB*1	12 ml
Buffer WA*1	28 ml
Buffer WB*2	24 ml
Elution Buffer	14 ml
Spin Columns	50 支
Collection tubes	50 支

*1 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

*2 首次使用前，请添加 56 ml 的 100%乙醇，混合均匀。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 灭菌水
- ◆ PBS 溶液

● 保存与运输

1. 本试剂盒分两部分保存，Part I 请保存在-20℃；Part II 于室温下（15-25℃）保存。
2. 本试剂盒分两部分运输，Part I 请在-20℃条件下运输；Part II 于室温下（15-25℃）运输。

● 实验前的准备

1. 准备 56℃水浴。
2. Buffer GL 若出现沉淀，请于 65℃加热溶解，待恢复至室温后使用。
3. Buffer WB 在首次使用前，请添加 56 ml 的 100%乙醇，混合均匀。
4. 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时，将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65℃使用将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

● 操作方法

操作流程见图 1，细胞或组织裂解后全套操作约需 20 分钟（如果组织需要裂解，则所需时间因组织不同而不同），分为组织或细胞裂解、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，详细说明如下：

1. 组织或细胞的裂解：

使用不同的实验材料需采用不同的裂解步骤，具体说明如下：

◆ 动、植物组织，深加工品的裂解：

- ① 取 2~25 mg 的动物组织、深加工品或 25~100 mg 植物组织（切勿使用超过最大起始量的组织），置于 2 ml tube 中，用剪刀尽可能地剪成碎块，对于一些质地坚硬的组织也可以进行液氮研磨。
- ② 加入 180 μ l 的 Buffer GL、20 μ l 的 Proteinase K 和 10 μ l 的 RNase A（10 mg/ml），于 56°C 水浴温浴至组织完全裂解（2~3 小时，难裂解的材料可以适当延长裂解时间甚至过夜裂解。植物材料可能残存纤维状组织无法完全裂解，裂解之后先 12,000 rpm 离心 2 分钟，去除杂质之后再行后续操作）。
- ③ 向裂解液中加入 200 μ l Buffer GB 和 200 μ l 100%乙醇，充分吸打混匀。

◆ 全血的裂解：

- ① 有核红细胞全血取 1~10 μ l（含抗凝剂）、无核红细胞全血取 50~100 μ l（含抗凝剂）加入至 2 ml Tube 中，用 PBS 溶液或灭菌水补至 200 μ l。
- ② 加入 180 μ l 的 Buffer GB、20 μ l 的 Proteinase K 和 10 μ l 的 RNase A（10 mg/ml），充分吸打混匀，于 56°C 水浴温浴 10 分钟。
- ③ 向裂解液中加入 200 μ l 100%乙醇，充分吸打混匀。

◆ 悬浮培养的动物细胞的裂解

- ① 用 1.5 ml Tube 收集 $1.0E+05$ ~ $1.0E+07$ 的细胞悬浮液，5,000 rpm 离心 5 分钟，弃上清（细胞培养液）。
- ② 加入 200 μ l 的灭菌水或 PBS 溶液悬浮细胞。
- ③ 加入 180 μ l 的 Buffer GB、20 μ l 的 Proteinase K 和 10 μ l 的 RNase A（10 mg/ml），充分吸打混匀，于 56°C 水浴温浴 10 分钟。
- ④ 向裂解液中加入 200 μ l 100%乙醇，充分吸打混匀。

◆ 贴壁细胞的裂解：

- ① 弃尽培养液，向每 10 cm^2 的贴壁细胞中加入 1 ml PBS，用移液枪的枪头吹落贴壁培养细胞，转移至 1.5 ml Tube 中，5,000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，加入 200 μ l 的灭菌水或 PBS 溶液悬浮细胞。
- ② 加入 180 μ l Buffer GB、20 μ l 的 Proteinase K 和 10 μ l 的 RNase A（10 mg/ml），收集细胞悬液，充分吸打混匀，于 56°C 水浴温浴 10 分钟。
- ③ 向裂解液中加入 200 μ l 100%乙醇，充分吸打混匀。

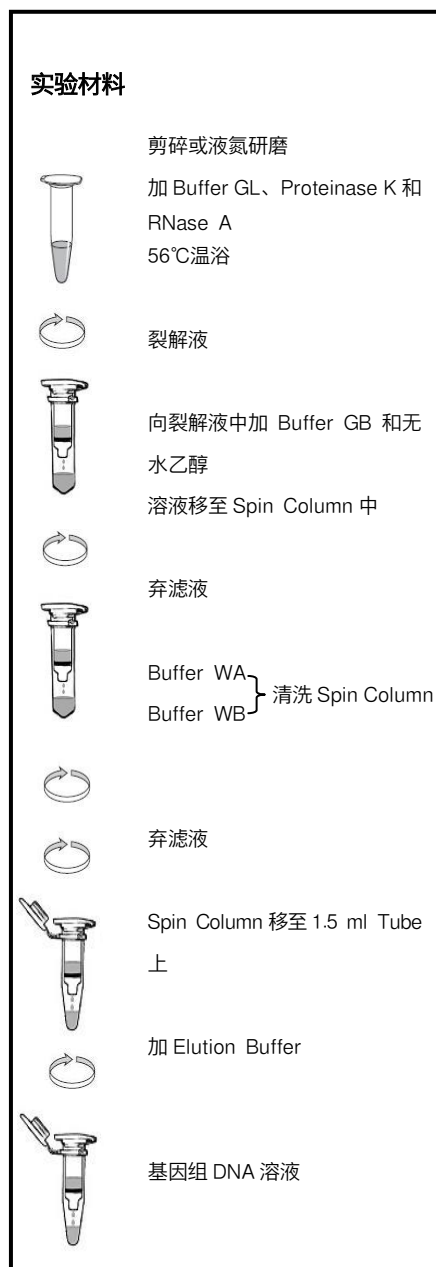


图 1. 操作流程简图

◆ *E.coli* 等革兰氏阴性菌的裂解:

- ① 用 1.5 ml Tube 收集 $1.0\sim 5.0E+09$ 的细胞, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 弃上清 (细胞培养液)。
 - ② 加入 180 μ l 的 Buffer GL、20 μ l 的 Proteinase K 和 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml), 充分吸打混匀, 于 56°C 水浴温浴 10 分钟。
 - ③ 加入 200 μ l 的 Buffer GB 和 200 μ l 100%乙醇, 充分吸打混匀。
2. 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 溶液移至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 弃滤液。
 3. 将 500 μ l 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
 4. 将 700 μ l 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
注) 请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。
请沿 Spin Column 管壁四周加入 Buffer WB, 这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
 5. 重复操作步骤 4。
 6. 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 分钟。
 7. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 50~200 μ l 的灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 5 分钟。
注) 将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65°C 使用时有利于提高洗脱效率。
 8. 12, 000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。
如需获得更大收量, 可将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央或再加入 50~200 μ l 的灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 5 分钟后, 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。
 9. 基因组 DNA 定量。
提取得到的基因组 DNA 可通过电泳或吸光度测定以定量。

● 实验例

1. 从动物组织中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 10 mg 的小鼠肝脏组织中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 5 μ g 的高纯度基因组 DNA; 处理了 1.2 cm 小鼠尾尖组织, 纯化得到了 10 μ g 的高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 2。

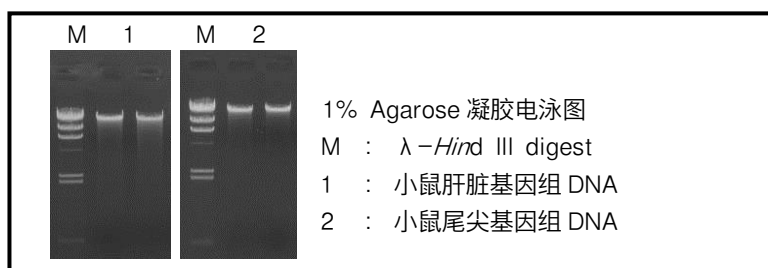


图 2. 从动物组织中提取的基因组 DNA

2. 从植物材料中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒处理了 100 mg 的菠菜、油菜、茼蒿、小白菜, 分别纯化得到了约 5 μ g、3 μ g、4 μ g、3.5 μ g 的高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 3。

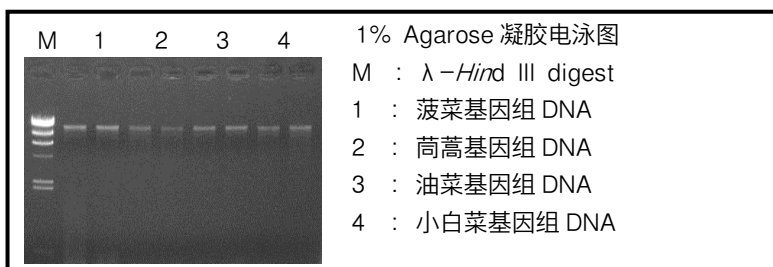


图 3. 从植物材料中提取的基因组 DNA

3. 从全血中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 5 μ l 的鱼全血 (含 EDTA 抗凝剂) 和 50 μ l 的小鼠全血 (含 EDTA 抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终分别纯化得到了约 12 μ g 和 1 μ g 的高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 4。

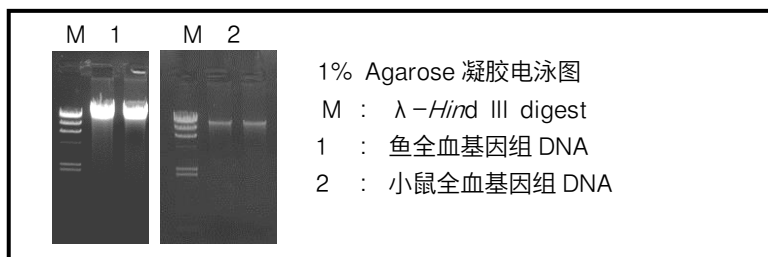


图 4. 从全血中提取的基因组 DNA

4. 从革兰氏阴性菌 *E.coli* 中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 2.0×10^9 的 *E.coli* JM109 培养细胞中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 10 μ g 的高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 5。

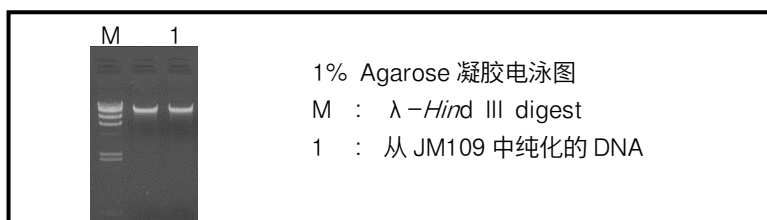


图 5. 从 JM109 中提取的基因组 DNA

5. 从鲤鱼鳍、鳃中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 25 mg 鲤鱼鳃、鳍中提取基因组 DNA, 最终分别纯化得到了约 5 μ g 以上的高纯度基因组 DNA, 其电泳结果见图 6。

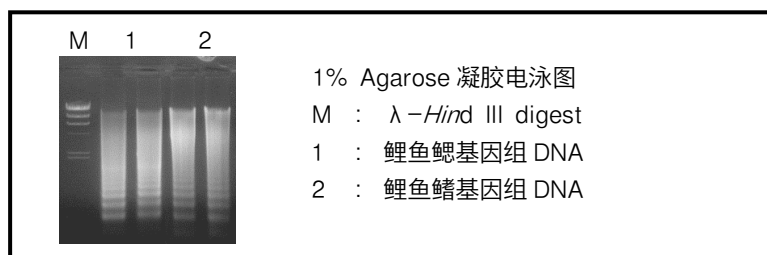


图 6. 从鲤鱼鳃、鳍中提取基因组 DNA

6. 从深加工品牛肉干中提取基因组 DNA, 并扩增 GenBank: V00654.1 基因的 528 bp 片段的实验例

使用本试剂盒从 25 mg 牛肉干中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 2 μ g 以上的 DNA, 并扩增了 GenBank: V00654.1 基因的 528 bp 片段, 其电泳结果见图 7。

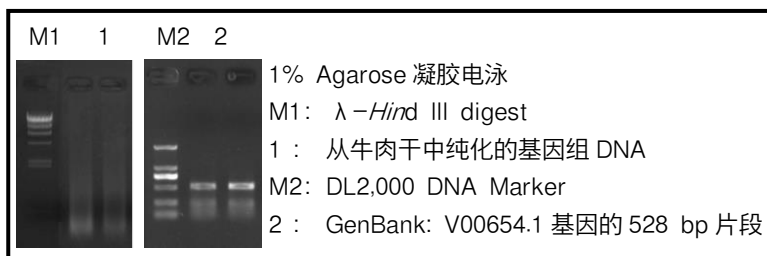


图 7. 从牛肉干中提取的基因组 DNA 及 PCR 扩增结果

7. 从 HL60 细胞中提取基因组 DNA，并扩增 β -Globin 基因的约 17.5 kb 的实验例
 使用本试剂盒从 $2.0E+06$ 的培养细胞 HL60 中提取基因组 DNA，最终纯化得到了约 $10 \mu\text{g}$ 的高纯度基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板，PCR 扩增了 β -Globin 基因的约 17.5 kb 的 DNA 片段，其电泳结果见图 8。

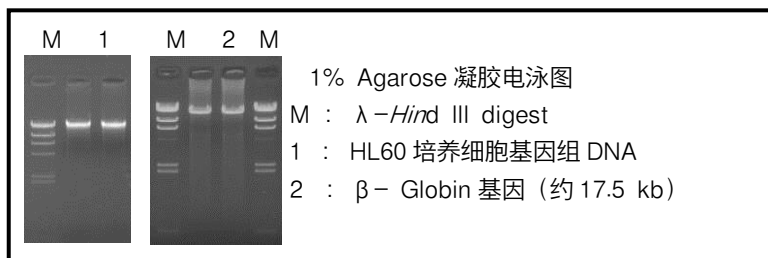


图 8. 从 HL60 细胞中提取的基因组 DNA 及 PCR 扩增结果

● 洗脱体积对 DNA 提取量和浓度的影响

使用本试剂盒提取 $2.0E+06$ HL60 细胞的基因组 DNA，洗脱时分别使用 $10 \mu\text{l}$ 、 $50 \mu\text{l}$ 、 $100 \mu\text{l}$ 、 $200 \mu\text{l}$ Elution Buffer 洗脱 2 次，DNA 收量如图 9 所示，增加洗脱液体积可以提高 DNA 收量，但是浓度会随之降低。

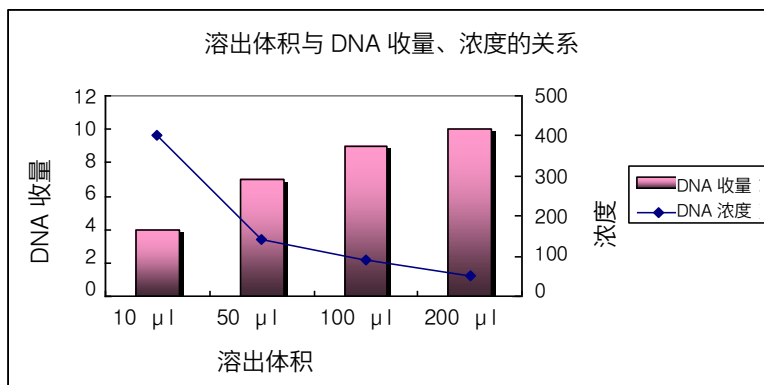


图 9. 洗脱体积对 DNA 提取量和浓度的影响

● 洗脱次数对 DNA 提取量的影响

使用本试剂盒从 10mg 和 25mg 的小鼠肝脏中提取基因组 DNA，最终分别用 $100 \mu\text{l}$ 和 $200 \mu\text{l}$ Elution Buffer 分三次进行洗脱，三次分别洗脱得到的 DNA 收量如图 10 所示。

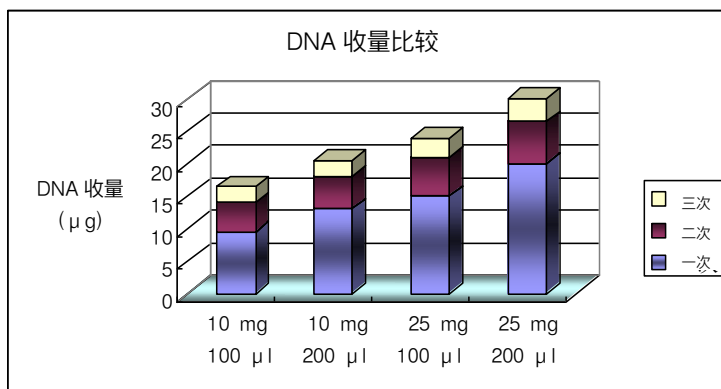


图 10. 洗脱次数对 DNA 提取量的影响

● 注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料，以确保提取的基因组 DNA 不被降解。
2. 使用液氮研磨组织材料时，应随时加入液氮，以确保提取的基因组 DNA 不被降解。
3. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时应寻求医疗咨询。
4. 基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 溶出。
5. 组织材料切勿超过最大起始量，且要充分裂解，否则可能影响收量，甚至会堵塞 Column。
6. 如果发生 Column 堵塞现象可提高离心力至 15,000 rpm，并适当延长离心时间。
7. 如果组织裂解后过于粘稠，可再添加一次相同体积的 Buffer GL、Proteinase K 和 RNaseA，继续裂解。

● 不同材料的 DNA 提取量

使用本试剂盒所能提取的 DNA 量如下：

材料	组织起始量	DNA 收量
小鼠肝脏	10 mg	5~10 μ g
小鼠脾脏	2~5 mg	5~20 μ g
小鼠尾巴	1.2 cm	10~15 μ g
小鼠脑	10 mg	4~10 μ g
小鼠肾	10 mg	5~10 μ g
小鼠肺	10 mg	5~10 μ g
小鼠肠	10 mg	5~10 μ g
小鼠耳	10 mg	4~10 μ g
鲤鱼鳍	25 mg	4~10 μ g
杂色蛤肉	10 mg	2~10 μ g
HL60 培养细胞	2.0E+06	10~15 μ g
<i>E.coli</i> JM109	2.0E+09	5~10 μ g
马血	100 μ l	2~5 μ g
鱼血	5 μ l	10 μ g
芹菜	100 mg	4~6 μ g
油菜	100 mg	2~5 μ g
菠菜	100 mg	2~5 μ g

● 实验材料最大起始量

实验材料	最大起始量	推荐使用量
培养细胞	1.0E+07	2.0E+06
有核红细胞全血	10 μ l	1~5 μ l
无核红细胞全血	100 μ l	50~100 μ l
<i>E.coli</i> 等革兰氏阴性菌	5.0E+09	2.0E+09
一般动物组织	25 mg	10~15 mg
DNA 含量丰富的组织 (如脾脏)	5 mg	2 mg
DNA 含量特别丰富的组织 (如小牛胸腺)	2 mg	1 mg
植物材料	100 mg	50~100 mg

● Q&A

Q1. 基因组 DNA 的收量如何?

A1. 本试剂盒适合于动物组织、一般植物材料、全血、培养细胞、革兰氏阴性菌的基因组 DNA 提取。基因组 DNA 的提取量根据组织材料的不同而各异, 一般情况下, 从 10 mg 的肝脏组织中, 可以提取约 5 μ g 的基因组 DNA; 从 100 mg 的菠菜中, 可以提取约 5 μ g 的基因组 DNA; 从 100 μ l 的人全血中, 可以提取约 0.5 μ g 的基因组 DNA; 从 2.0E+06 的培养细胞中, 可以提取约 10 μ g 的基因组 DNA; 从 2.0E+09 的 *E.coli* 细胞中, 可以提取约 10 μ g 的基因组 DNA。

Q2. 基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA, 为什么?

A2. 基因组 DNA 收量较低时, 可以从以下几个方面考虑:

- ① 实验材料量太少, 比如从 2×10^3 培养细胞中提取的基因组 DNA 就不能用电泳检测到;
- ② 裂解不充分, DNA 未充分释放, 建议要延长裂解时间 (过夜裂解) 或增加裂解液的量;
- ③ 提取的组织材料中基因组 DNA 含量较少, 适当增加起始组织量;
- ④ 起始组织量过大, 裂解困难, 按比例适当增加裂解液的加量或分成多份进行提取;
- ⑤ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65 $^{\circ}$ C 后使用将有利于提高洗脱效率;
- ⑥ 请严格按照操作方法进行操作。

Q3. 提取的基因组 DNA 有降解, 为什么?

A3. ① 选取的实验材料不够新鲜, 采集后的组织材料未及时处理或未低温保存。我们建议材料应尽量在 -80 $^{\circ}$ C 保存, 运输过程中亦应使用干冰等。
② 材料本身有残留的 DNA 酶活性。可以增加一次 Buffer WA 的清洗操作。

Q4. 提取的基因组 DNA 中有 RNA 污染, 为什么?

A4. ① 实验过程中没有使用 RNase A。应严格按照实验操作要求使用 RNase A。
② RNase A 可能失活。RNase A 尽可能在 -20 $^{\circ}$ C 下保存, RNase A 活性比较稳定, 一般不易失活。

Q5. 提取的基因组 DNA 反应性能差, 为什么?

A5. ① 提取的基因组 DNA 中盐份浓度过高。在使用 Buffer WA 和 Buffer WB 进行 DNA 制备膜的清洗时, 请沿 Spin Column 的管壁四周加入, 且加入 Buffer WB 后室温静置 5 分钟, 有助于彻底清洗掉 Column 上残留的盐离子, 这样有利于提高清洗效果。
② 洗脱液中残留乙醇, 在向 Column 中加入洗脱液之前, 将 Column 在室温下静置 2 分钟有助于使 Column 上残留的乙醇彻底挥发, 然后再加入洗脱液洗脱。
③ 进行 DNA 洗脱时请一定在膜的中央加入洗脱液, 尽量不要沾染 Spin Column 的管壁四周。

- Q6. 实验材料量若超出说明书规定用量时怎么办?
- A6. 本试剂盒主要用于小量基因组 DNA 的制备, 当实验材料量超出说明书的要求用量时, 可以加大 Buffer GL 或 Buffer GB 的用量, 裂解后分到两个 Collection Tube 中进行实验操作。起始组织量最好控制在规定的范围内, 可以分几份进行, 否则起始量过大会影响裂解和收量, 如果裂解不充分会堵塞柱子, 造成实验失败。
- Q7. 进行深加工品的 DNA 提取时, 有哪些注意事项?
- A7. 有的深加工品材料本身 DNA 含量非常少, 并且加工之后导致 DNA 断裂, 所以电泳时可能检测不到明显的 DNA 条带, 可以直接进行 PCR 检测。

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da