

D3096 MicroElute Genomic DNA Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释以下试剂

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3096-00	8mL
D3096-01	80mL
D3096-02	80mL (每瓶)

➤ 线性丙烯酰胺：为了从极少量的样品中纯化 DNA，例如少量血液 (<10μl) 或微切割组织，建议在 Buffer BL 中加入线性丙烯酰胺，以增强对柱的 DNA 结合能力。

提取步骤：

A. 微量组织提取

可选：虽然不需要将组织匀浆化，但液氮研磨可改善裂解效果，并缩短裂解时间，液氮蒸发后，即刻将组织粉末转移至新的 1.5mL 离心管中，加入 200μl Buffer TL，接着按照步骤 2 进行下去即可。

1. 将不超过 10mg 的组织加入到 1.5mL 离心管中，加入 200μl Buffer TL，可将组织剪碎更有利于裂解；
2. 加入 20μl OB Protease Solution，涡旋混匀，在 55°C 震荡水浴孵化；如果没有震荡水浴锅，可在普通水浴锅进行孵育，孵育期间每隔 20-30min 取出涡旋，裂解时间不要超过 3h，对于困难提取样品可过夜孵化；
3. 20,000xg 离心 2min，小心转移上清液，注意不要转移到不溶物；
4. 选做：某些组织如肝脏中 RNA 的含量较高，该试剂盒会将 RNA 与 DNA 一起提取，RNA 不会对 PCR 造成干扰，可在此步除去 RNA。加入 5μl (样品量为 10mg) RNase A (25mg/mL)，在室温下孵育 2min，继续进行以下步骤；
5. 加入 220μl Buffer BL，涡旋混匀，在 70°C 孵育 10min；如果需要加入线性丙烯酰胺，可将 4μl 线性丙烯酰胺加入到 220μl Buffer BL；
6. 加入 220μl 无水乙醇，最大速度涡旋混匀 15s，短暂离心甩下残留在管盖的液体；
7. 将 HiBind® MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中，转移步骤 6 中的混合液 (包括沉淀物) 到 HiBind® MicroElute column 中，8,000xg 离心 1min，弃滤液；
8. 将 HiBind® MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中，加入 500μl Buffer HB，8,000xg 离心 1min，弃滤液；
9. 将 HiBind® MicroElute column 套回到 2mL 收集管中，加入 650μl DNA Wash Buffer，8,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

10. 重复步骤 9;
11. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 (20,000xg) 空柱子离心 3min 干燥, 该步骤可将残留的乙醇甩掉, 以免对下游实验产生干扰。
12. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 10-50 μ l 在 70°C 预热的 Elution Buffer 或无菌水, 室温静置 3min;
13. 20,000xg 离心 1min 洗脱 DNA。

Note: 在 70°C 孵育比在室温静置洗脱 DNA 的效果更好, 可将第一次洗脱的洗脱液重新加回到柱子中进行二次洗脱, 也可以加入新的 10-100 μ l Elution Buffer 或无菌水进行洗脱。

B. 微量血液、血清或体液提取

1. 取 1-100 μ l 样品 (实验前样品必须解冻至室温) 加入到 1.5mL 离心管, 加入 PBS Buffer 将体积调整到 100 μ l;
2. 加入 20 μ l Protease solution, 涡旋混匀;
3. 加入 120 μ l Buffer BL, 涡旋混匀, 在 70°C 孵育 10min, 如果血液体积小于 10 μ l, 建议在每个样品中加入 4 μ l 线性丙烯酰胺;
4. 加入 120 μ l 无水乙醇, 最大速度涡旋 15s, 短暂离心将管盖上的液体甩下;
5. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中, 转移步骤 4 中的混合液 (包括沉淀物) 到 HiBind[®] MicroElute column 中, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液;
6. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l Buffer HB, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液;
7. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 重复步骤 7;
9. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 (20,000xg) 空柱子离心 3min 干燥, 该步骤可将残留的乙醇甩掉, 以免对下游实验产生干扰。
10. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 10-50 μ l 在 70°C 预热的 Elution Buffer 或无菌水, 室温静置 3min;
11. 20,000xg 离心 1min 洗脱 DNA。

C. 干血、体液和精子斑提取

可以使用以下方法处理滤纸上的干血，体液和精子样品。建议使用 OBI 样本纸 (OBP-01 和 OBP-02) 来检测血液，因为这种独特的滤纸在水性缓冲液中孵育时会分解，从而有效回收 DNA。该试剂盒也可用于使用其他标本收集纸收集的样品。

1. 从滤纸上剪下或冲下血液 (或其他样品) 斑点，将剪下或撕碎的滤纸放入到 1.5mL 或 2mL 离心管中；

Note: 每个样品用 1-3 个打孔圆 (直径 3mm) 进行 DNA 提取。

2. 加入 200 μ l Buffer TL 到直径为 3mm 的 1-3 个打孔圆中，加入 20 μ l OB Protease solution，在 60 $^{\circ}$ C 孵育 45-60min，孵育期间取出涡旋混匀几次。

3. 简单离心甩下管盖中的溶液；

4. 加入 220 μ l Buffer BL，最大速度涡旋混匀 20s，如果只有一张打孔圆，则加入 1 μ l 线性丙烯酰胺；

5. 将离心管放入到 70 $^{\circ}$ C 中孵育 10min，期间取出几次涡旋 10s；

6. 简单离心甩下管盖中的溶液；

Note: 为获取最大产量，可收集滤纸中残留的液体，将所有的样品转移到 Homogenizer Column (未提供) 中，20,000xg 离心 2min，收集裂解液；Homogenizer Column 可与 Omega Bio-tek 分开购买 (产品货号: HCR-001 和 HCR-003)

7. 加入 220 μ l 无水乙醇，最大速度涡旋混匀 20s，简单离心甩下管盖中液体；

8. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 7 中的裂解液 (包括沉淀物) 至 HiBind[®] MicroElute column，8,000xg 离心 2min，弃滤液；

9. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中，加入 500 μ l Buffer HB，8,000xg 离心 1min，弃滤液；

10. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中，加入 650 μ l DNA Wash Buffer，8,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 重复步骤 10；

12. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (15,000xg) 空柱子离心 3min 干燥，该步骤可将残留的乙醇甩掉，以免对下游实验产生干扰。

13. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 10-50 μ l 在 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer 或无菌水，室温静置 3min；

14. 20,000xg 离心 1min 洗脱 DNA。

Note: 在 70 $^{\circ}$ C 孵育比在室温静置洗脱 DNA 的效果更好，可将第一次洗脱的洗脱液重新加回到柱子中进行二次洗脱，也可以加入新的 10-100 μ l Elution Buffer 或无菌水进

行洗脱。

D. 从拭子中分离基因组 DNA 方案

1. 将拭子样品放入到 2mL 离心管中;
2. 加入 600 μ l Buffer TL 和 20 μ l Protease solution, 最大速度涡旋混匀 30s;
3. 将离心管放置到 55 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 期间取出涡旋混匀数次;
4. 简单离心将管盖上的溶液甩下;
5. 加入 620 μ l Buffer BL, 涡旋混匀, 如果需要加入线性丙烯酰胺, 将 4 μ l 线性丙烯酰胺加入到 660 μ l Buffer BL;
6. 将离心管放入 70 $^{\circ}$ C 中孵育 10min, 期间取出数次涡旋混匀 10s;
7. 简单离心将管盖上的溶液甩下;
8. 加入 620 μ l 无水乙醇, 最大速度涡旋混匀 20s, 简单离心将管盖上的溶液甩下;
9. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 8 中的 700 μ l 裂解液 (包括沉淀物) 至 HiBind[®] MicroElute column, 8,000xg 离心 2min, 弃滤液;
10. 重复步骤 9, 直至将所有裂解液全部过柱;

Note: 为获取最大产量, 可收集滤纸中残留的液体, 将所有的样品转移到 Homogenizer Column (未提供) 中, 20,000xg 离心 2min, 收集裂解液; Homogenizer Column 可与 Omega Bio-tek 分开购买 (产品货号: HCR-001 和 HCR-003)

11. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l Buffer HB, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液;
12. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

13. 重复步骤 12;
14. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 (20,000xg) 空柱子离心 3min 干燥, 该步骤可将残留的乙醇甩掉, 以免对下游实验产生干扰。
15. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 10-50 μ l 在 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer 或无菌水, 室温静置 3min;
16. 20,000xg 离心 1min 洗脱 DNA。

E. 法医样本方案

1. 将样品剪碎放入到 2mL 离心管中, 加入 300 μ l Buffer TL, 涡旋混匀。如果是处理精液, 每个样品中加入 20 μ l DTT。
2. 加入 20 μ l OB Protease solution, 60 $^{\circ}$ C 孵育 45-60min, 如果有必要可以孵育过夜,

孵育期间取出几次涡旋混匀；

3. 简单离心将管盖上的溶液甩下；
4. 加入 320 μ l Buffer BL, 涡旋混匀 20s。如果只有一张打孔圆, 则需加入 4 μ l 线性丙烯酰胺；
5. 将离心管置于 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 期间取出数次涡旋 10s；
6. 20,000xg 离心 5min, 将上清液转移到新的 2mL 离心管中, 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 最大速度涡旋混匀 20s, 简单离心将管盖上的溶液甩下；
7. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到 2mL 收集管中, 转移步骤 6 中的 600 μ l 裂解液 (包括沉淀物) 至 HiBind[®] MicroElute column, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液；
8. 重复步骤 7, 直至将所有裂解液全部过柱；
9. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l Buffer HB, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液；
10. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 加入 650 μ l DNA Wash Buffer, 8,000xg 离心 1min, 弃滤液；
Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
11. 重复步骤 10；
12. 将 HiBind[®] MicroElute column 套回到 2mL 收集管中, 最大速度 (20,000xg) 空柱子离心 3min 干燥, 该步骤可将残留的乙醇甩掉, 以免对下游实验产生干扰。
13. 将 HiBind[®] MicroElute column 套入到新的 1.5mL 离心管中, 加入 10-50 μ l 在 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer 或无菌水, 室温静置 3min；
14. 20,000xg 离心 1min 洗脱 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准