

D3396 Tissue DNA Kit

中文简易说明

√实验前请按说明书正确稀释以下溶液。

➤ 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
D3396-00	6mL
D3396-01	60mL
D3396-02	80mL (每瓶)

➤ 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存。

货号	加入量
D3396-00	1.2mL
D3396-01	10mL
D3396-02	32mL

➤ 使用前请检查溶液是否由于低温或静置析出沉淀，如有，请置于 37°C 孵育至完全溶解再使用。

提取步骤：

A. 组织基因组 DNA 提取

以下方案可从最多 30mg 组织中提取基因组 DNA，产量取决于样品来源。

可选步骤：虽然使用机械匀浆器匀浆组织并非必要，但是用液氮研磨组织可以提高裂解效果和减少孵育时间。当液氮挥发完后，将粉末转移至 1.5 mL 的离心管中，加入 200μl Buffer TL，开始第二步操作；

1. 称取 ≤30 mg 的组织，加入到 1.5mL 的离心管中，加入 200μl TL Buffer。将样品剪成一块块小块可以加速裂解效果。如果样品大于 30mg，可按比例提高 Buffer TL 的用量，如样品为 60mg，则加入 400μl Buffer TL。
2. 加入 25μl OB Protease Solution，涡旋混匀，放置在 55°C 水浴摇床中振荡孵育至组织完全消化。如果没有水浴摇床，水浴期间每隔 20-30min 拿出涡旋混匀一次。消化时间取决于样品使用量和组织类型，一般 3 小时就能获得良好的裂解效果。
3. (选做) 某些组织例如肝脏包含有高丰度的 RNA，它可能会和 DNA 一起回收出来，虽然 RNA 的污染并不会影响 PCR 操作，但可以在这个步骤将其去除。可加入 5μl (对于 30mg 的样品) RNaseA(25mg/mL)混匀，于室温下放置 2-5min，继续下面的操作；
4. 室温下，10,000×g 离心 5min 去除不溶解的杂质，小心将上清液转移到新的 1.5mL

离心管中而留下不溶解的杂质。

5. 加入 220 μ l BL Buffer, 涡旋混匀。70°C水浴 10min。加入 Buffer BL 后, 可能会产生一些沉淀, 但不会影响 DNA 的回收。根据样品的使用量调节 Buffer BL 的体积;

6. 加入 220 μ l 无水乙醇 (室温, 96-100%), 最高速度涡旋以充分混匀。如果样品的用量超过 30mg, 调节无水乙醇的用量; 如果这时候看到沉淀, 用枪头吹打 10 次以吹散沉淀。

7. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2mL 收集管中 (已提供), 将第 6 步得到的所有溶解液转入 HiBind[®] DNA 结合柱中 (包括所有的沉淀物), 8,000 \times g 离心 1min 以结合 DNA, 弃滤液和收集管。

8. (选做)如果样品多于 30mg, 就按照上面的步骤把剩下的裂解液转入 HiBind[®] DNA 结合柱, 确保所有的溶液都通过 HiBind[®] DNA 结合柱;

9. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在新的 2mL 收集管中, 加入 500 μ l HBC Buffer 至 HiBind[®] DNA 结合柱中, 8,000 \times g 离心 1min, 弃滤液和收集管;

Note: HBC Buffer 使用前必须按照说明书用异丙醇进行稀释。

10. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在新的 2mL 收集管中, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer 至 HiBind[®] DNA 结合柱中, 8,000 \times g 离心 1min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

11. 重复步骤 10, 用 DNA Wash Buffer 进行二次洗涤;

12. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在同一个 2mL 收集管中, > 12,000 \times g 离心空甩 2min 以干燥 HiBind[®] DNA 结合柱的基质。

13. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在新的 1.5mL 灭菌离心管, 加入 50-200 μ l 预热至 70°C Elution Buffer 至 HiBind[®] DNA 结合柱的膜中央。室温静置 3min;

14. 室温下, 10000 \times g 离心 1min, 以洗脱 DNA。

15. 重复步骤 13-14。

注意: 每次洗脱可得到 60%-70%结合于柱上的 DNA, 因此两次洗脱的总量一般可大于 90%。然而, 增加洗脱体积会减少最终产物的浓度。若想得到高浓度的 DNA, 可使用 50 μ l ~ 100 μ l 的 Elution Buffer 来洗脱 (产量将略微下降)。洗脱体积低于 50 μ l 将大大减少产量。在某些情况下, 加入 Elution buffer 后可以在 70°C 温育 HiBind[®] DNA 结合柱以提高产量。另外可以使用第一次洗脱液进行第二次洗脱。

16. 将洗脱的 DNA 保存至 -20°C。

B. 从培养细胞中提取基因组 DNA

该方案适合于从 5×10^6 个细胞中纯化 25 μ g 的基因组 DNA。

1. 准备细胞重悬液

- a. 冰冻的细胞样品必须在开始之前进行解冻。离心收集细胞，用 PBS 缓冲液洗涤一次，加入 200 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞，按照步骤 2 进行操作；
- b. 如果细胞悬浮生长，1,200xg 离心收集 5×10^6 个细胞，去除培养基，用 PBS 缓冲液洗涤一次，加入 200 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞，按照步骤 2 进行操作；
- c. 如果细胞贴壁生长，用胰蛋白酶消化后，收集细胞，用 PBS 缓冲液洗涤两次，加入 200 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞，按照步骤 2 进行操作；

2. 加入 25 μ l OB Protease Solution，涡旋混匀；

3. (选做) 某些培养细胞包含有高丰度的 RNA，它可能会和 DNA 一起回收出来，一般情况下，RNA 的污染并不会影响 PCR 操作，但可以在这步将其去除。因此，可加入 4 μ l RNase A(100mg/mL)混匀，于室温下放置 2-5min，继续下面的操作。

4. 加入 220 μ l Buffer BL，涡旋混匀（室温，96-100%）；放置 70 $^{\circ}$ C 水浴 10min。加入 BL Buffer 后，可能会产生一些纤维状沉淀，但不会影响 DNA 的回收。根据样品的使用量调节 BL Buffer 的体积；

5. 加入 220 μ l 无水乙醇，高速涡旋混匀。根据样品的用量，调节无水乙醇的用量；如果这时候看到沉淀，可用枪头吹打 10 次打散沉淀。

6. 下面的操作请参照组织 DNA 提取方案的 7-16 步。

C. 从老鼠尾巴中提取基因组 DNA

把已冻藏的样品和 OB 蛋白酶溶液放到室温下，70 $^{\circ}$ C 预热 Elution Buffer(每个样品要 0.5mL)。

1. 剪碎长度为 0.2-0.5cm 的老鼠尾巴放置于 1.5mL 的离心管中。如果有必要的话，可灼烧伤口以防止流血。可适当地在动物耳朵上做标记，放到干净笼子里。

注：老鼠年龄不能超过 6 个星期，因为超过 6 个星期后，老鼠尾巴将很难裂解而很难得到理想的回收产物。如可能的话，可在小鼠 2-4 个星期时，切出小鼠尾巴，然后保存于 -70 $^{\circ}$ C。

2. 加入 200 μ l TL Buffer 和 25 μ l OB Protease Solution，涡旋混匀；

3. 55 $^{\circ}$ C 摇床水浴 1-4h，如果没有摇床水浴锅，可在水浴期间每隔 20-30min 取出涡旋；加入 25 μ l OB 蛋白酶，涡旋混匀，放置 55 $^{\circ}$ C 水浴摇床孵育 1-4 小时或至充分裂解。

如果没有水浴摇床，水浴期间，每隔 20-30min 拿出涡旋混匀一次。不充分的裂解会导致柱子阻塞而降低 DNA 产量。样品的消化时间取决于小鼠尾巴的使用量和老鼠的年龄。2 周大的小鼠的 0.5cm 尾巴一般只需要 2 小时就能获得良好的效果。对于年龄老的小鼠可消化过夜。注：骨和毛是不能消化的。

(选做) 小鼠尾巴中的 RNA 可能会和 DNA 一起纯化出来。一般情况下，RNA 的污染不会影响到 PCR 反应，但可能会影响其它酶促反应。如需去除 RNA，可加入 15 μ l RNaseA(25mg/mL)混匀，于室温孵育 2min。

4. 室温下，10,000 \times g 离心 5min 沉淀去除不溶解的杂质和毛发。小心转移上清液至新的 1.5mL 离心管中，在吸取上清液时，不要吸到任何沉淀物。
5. 加入等体积的 BL Buffer 和等体积的无水乙醇，最高速度涡旋混匀。涡旋混匀是必需的。如果这时候看到沉淀，可通过颠倒混匀沉淀。
6. 下面的操作请参照组织 DNA 提取方案的步骤 7-16。

D. 从石蜡包埋的组织中提取基因组 DNA

1. 剪称不超过 30mg 的组织 (~2mm³) 于 2mL 离心管中；
2. 加入 1mL 二甲苯，充分涡旋混匀以去除石蜡；
3. 室温下，10,000 \times g 离心 10min；吸取上清液，不要碰到组织沉淀；
4. 加入 1mL 无水乙醇洗涤去除二甲苯，室温下，最大速度离心 5min；弃上清液，不要倒出组织沉淀；
5. 重复步骤 4，用无水乙醇再次洗涤；
6. 37 $^{\circ}$ C，空气干燥 15min；
7. 加入 200 μ l TL Buffer 和 25 μ l OB Protease Solution，涡旋混匀，放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴摇床中振荡孵育至组织完全消化。

Note: 如果没有水浴摇床，水浴期间每隔 20-30min 拿出涡旋混匀一次。消化时间取决于样品使用量和组织类型，一般 3 小时就能获得良好的裂解效果。

8. 在 90 $^{\circ}$ C 孵育 30-60min；
9. 然后按“组织 DNA 提取方案”的第 3 步起开始往下操作；

注：组织中含有多聚甲醛，会导致 RNA 或 DNA 降解，降解的程度取决于固定剂的类型，但是得到的 DNA 通常都小于 500bp。降解的原因跟 E.Z.N.A.组织 DNA 提取方案无关，而 PCR 检测 500bp 以下片断可以得到良好结果。

E. 全血与体液 DNA 提取方案

1. 将样品转移到 1.5mL 离心管中, 加入 10mM Tris-HCl、PBS 或 Elution Buffer 将样品体积调整至 250 μ l;

2. 加入 25 μ l OB Protease Solution 和 250 μ l BL Buffer, 涡旋混匀;

Note: 加入 BL Buffer 后, 可能会产生一些纤维状沉淀, 但不会影响 DNA 的回收。

(选做) 如果需要, RNA 可在此步除去:

(1) 加入 4 μ l RNase A (100mg/mL) ;

(2) 室温下静置 2min;

(3) 接着步骤 3;

3. 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 期间取出涡旋混匀一次;

4. 加入 250 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀;

5. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2mL 收集管中, 将第 4 步得到的所有溶解液转入 HiBind[®] DNA 结合柱中, 最大速度 ($\geq 10,000\times g$) 离心 1min 以结合 DNA, 弃滤液;

6. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在 2mL 收集管中, 加入 500 μ l HBC Buffer, 最大速度离心 30s, 弃滤液;

Note: HBC Buffer 使用前必须按照说明书用异丙醇进行稀释。

7. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在新的 2mL 收集管中, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer 至 HiBind[®] DNA 结合柱中, 最大速度离心 30s, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。

8. 重复步骤 7, 用 DNA Wash Buffer 进行二次洗涤;

9. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在同一个 2mL 收集管中, 最大速度离心空甩 2min 以干燥 HiBind[®] DNA 结合柱的基质。

10. 将 HiBind[®] DNA 结合柱套在新的 1.5mL 灭菌离心管, 加入 50-200 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至 HiBind[®] DNA 结合柱的膜中央。室温静置 2min;

11. 室温下, 最大速度离心 1min, 以洗脱 DNA。

12. 重复步骤 10-11;

注意: 每 200 μ l Elution Buffer 洗脱可得到 60%~70% 结合于柱上的 DNA, 因此两次洗脱的总量一般可大于 90%。然而, 增加洗脱体积会减少最终产物的浓度。若想得到高浓度的 DNA, 可使用 50 μ l-100 μ l 的 Elution Buffer 来洗脱 (产量将略微下降)。洗脱体积低于 50 μ l 将大大减少产量。在某些情况下, 加入 Elution buffer 后可以在 70 $^{\circ}$ C 温育 HiBind[®] DNA 结合柱以提高产量。另外可以使用第一次洗脱液进行第二次洗脱。

13. 将洗脱的 DNA 保存至 -20 $^{\circ}$ C。

F. 组织基因组 DNA 提取 - 真空/离心方案

根据组织基因组 DNA 提取方案, 完成对样品的裂解, 匀浆, 蛋白酶消化, 和上 HiBind[®] DNA 结合柱。按照下面的步骤来代替了连续的离心操作。

1. 按照使用说明准备好真空抽滤盒, 然后把 V-Spin DNA 结合柱连接到真空抽滤盒上。
2. 把样品转入 V-Spin HiBind[®] DNA 结合柱。
3. 打开抽滤装置, 让样品通过 HiBind[®] DNA 结合柱, 然后关掉抽滤装置。
4. 加入 500 μ l HBC Buffer 洗涤 HiBind[®] DNA 结合柱, 打开真空抽滤装置, 让溶液通过 HiBind[®] DNA 结合柱。
5. 加入 700 μ l DNA Wash Buffer 通过抽滤洗涤 HiBind[®] DNA 结合柱。
6. 重复步骤 5。
7. 把 HiBind[®] DNA 结合柱套上 2mL 的收集管, 最高速度离心, (不高 20,000xg) 2min, 甩干 HiBind[®] DNA 结合柱的基质。
8. 把 HiBind[®] DNA 结合柱套上干净的 1.5mL 离心管, 加入 100-200 μ l Elution Buffer, 静置 1-2min, 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