

## 昆虫基因组 DNA 分离试剂盒简明说明书(BW-GD2413)

## 产品简介

昆虫 gDNA 分离试剂盒是为高效提取昆虫、节肢动物、蛔虫、扁形虫基因组 DNA 设计的。亦适用于冷冻的、或保存于乙醇或 DNE 溶液的样品，福尔马林保存的材料效果也良好。

样品需要均质化，然后在高盐缓冲液中裂解，用氯仿提取，去除粘多糖。紧接着乙醇快速沉淀，调整结合条件，DNA 通过 DNA Mini Column 进一步被纯化。通过 wash buffer 去除盐、蛋白质和其它杂质，产生高质量的基因组 DNA。纯化后的基因组 DNA 适用于核酸内切酶消化、PCR、杂交技术等下游应用。

## 产品构成

| Catalog#              | -00    | -01    | -02        |
|-----------------------|--------|--------|------------|
| Preps                 | 4      | 50     | 250        |
| DNA Mini Columns      | 4      | 50     | 250        |
| 2 mL Collection Tubes | 4      | 50     | 250        |
| Buffer MTL            | 2 mL   | 20 mL  | 90 mL      |
| Buffer MBL            | 2 mL   | 22 mL  | 100 mL     |
| Buffer KB             | 3 mL   | 26 mL  | 130 mL     |
| Proteinase K          | 150 µL | 1.5 mL | 5 x 1.3 mL |
| RNase A (20 mg/mL)    | 30 µL  | 280 µL | 1.3 mL     |
| DNA Wash Buffer*      | 2 mL   | 15 mL  | 3 x 24 mL  |
| Elution Buffer        | 2 mL   | 15 mL  | 30 mL      |
| User Manual           | 1      | 1      | 1          |

## 要点

- DNA Wash Buffer: 加入 8 mL (BW-GD2413-00) 或 60 mL (BW-GD2413-01) 或 96 mL (BW-GD2413-02) 96-100%乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。

## 产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月，请按以下方式储存：

Proteinase K 可在室温稳定储存一年。若要长期储存请分装后置干-20℃保存。其他试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。

## 实验前需准备的材料

- 离心机（12,000 ×g）
- 无核酸酶的 1.5 mL 或 2 mL 离心管
- 水浴锅
- 65℃预热 Elution Buffer
- 无水乙醇
- 氯仿：异戊醇（24:1）

保存在福尔马林中的昆虫标本应在二甲苯中清洗，然后用乙醇处理。注意：福尔马林固定组织的结果一般取决于样本年龄和大小。纯化后的 DNA 可用于 PCR 扩增，但是新鲜或冷冻样品纯化后的 DNA 只能用于 Southern analysis。

请于室温下进行所有步骤（包括离心）。

## 操作步骤

## 昆虫

1. 使用研钵和研杵，液氮作用下研磨不超过 30 mg 的组织，将

粉末置于一个干净的 1.5 mL 离心管内。如果没有陶瓷的研钵和研杵，可使用一次性离心管和研杵，在离心管内研磨均质化。然后按步骤 2 操作。

## 节肢动物和其它软组织无脊椎动物

1. 用研钵和研杵将不超过 30 mg 的组织置于液氮下研磨至粉末，将粉末转移至一个干净的 1.5 mL 离心管内。如果没有陶瓷的研钵和研杵，可使用一次性离心管和研杵，在离心管内研磨均质化。加入适量 50-70 目的白色石英砂对样本的均质化有所帮助。然后按步骤 2 操作。

2. 加入 **350 µL Buffer MTL** 和 **25 µL Proteinase K**，涡旋混匀，55℃孵育 30 min 以上，直至整个样品溶解。实际孵育时间因组织的不同而有所差异。大多数样品不需要超过 4 h。另外，37℃孵育过夜将会得到较好的结果。

3. 加入 350 µL 氯仿：异戊醇（24:1），涡旋 5 s 混匀，10,000 ×g 室温离心 2 min，小心转移上层水相至一个干净的 1.5 mL 离心管内。避免吸到交界处的乳白色杂质和抑制剂。

**注：**该步骤可从溶液中去大部分多糖和蛋白质，并提高下游 Mini Column 的性能。若离心后上层水相含量很少，加入 200 µL Buffer MTL，涡旋混匀，如上所述再次离心并将水相转移至离心管内。

4. 加入 **1 倍体积** 的 **Buffer MBL** 和 **5 µL RNase A**，最大速度涡旋 10 s。70℃孵育 10 min。

5. 加入 1 倍体积的 96%-100%乙醇（室温），最大速度涡旋混匀 10 s。

**注：**500 µL 上层水相，加入 500 µL Buffer MBL 和 500 µL 100%乙醇。

6. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**，

加入步骤 5 获得的 **750 μL** 混合液(包括可能形成的沉淀)至 **DNA Mini Column**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

7. 将 **DNA Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，转移剩余的混合液至 **Mini Column** 内，按上述描述离心，弃滤液。

8. 加入 **500 μL Buffer KB**，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液。

9. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液。

**注：**DNA Wash Buffer 作为浓缩液提供，使用前请务必按照瓶身要求加入乙醇。若冷藏过，使用前请置于室温。

10. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，10,000 ×g 离心 30 s，弃滤液，将 **Mini Column** 插回 **2 mL Collection Tube**，开盖。

11. 12,000 ×g 离心 2 min，去除残留乙醇。

12. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **50-100 μL** 预热至 65℃的 **Elution Buffer**，室温静置 2 min，12,000 ×g 离心 1 min。

**可选：**将洗脱下的 DNA 重新上柱二次洗脱将会获得另外 20-30% 的DNA，第一次洗脱可得到 60-70%的DNA。洗脱体积小于 50 μL 将大大减少产量。加入 Elution Buffer 后，65℃孵育（而不是室温）将会增加产量。

DNA 质量和浓度的确定

将洗脱下来的 DNA 溶液用 Elution Buffer 或 10 mM Tris，pH 8.0 稀释 10-20 倍，在 280 nm 和 260 nm 处测量吸光度，确定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值。值在 1.7-1.9 通常表明 DNA 的纯度在 85-90%。DNA 浓度可通过如下方式计算：

浓度=50 μg/mL x A<sub>260</sub> x （稀释倍数）

常见问题解答

| 问题                                      | 可能原因                      | 建议                                                     |
|-----------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| 柱子堵塞                                    | 裂解不完全                     | 加入 Buffer MTL/Proteinase K 后，增加孵育时间。有必要可以过夜孵育。         |
|                                         | 样品太大                      | 不要使用超过建议的初始样品量，对于大的样品，可分成多管进行操作。                       |
|                                         | 没有充分均质化                   | 液氮作用下研磨样品至粉末。                                          |
| 低 DNA 得率                                | 柱子堵塞                      | 参考上述建议。                                                |
|                                         | 洗脱效率低                     | 进行二次洗脱，或增加洗脱体积。离心前于 65℃孵育 5 min。                       |
|                                         | 柱子吸附不彻底                   | 严格按照操作步骤调整 DNA 结合条件。                                   |
|                                         | 漂洗不当                      | 使用前按瓶身要求在 DNA Wash Buffer 内加入乙醇。                       |
| 低的 A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 值 | 洗脱时离心转速太大                 | 柱子上的膜可能由于离心速度太大存在于洗脱液中，可通过离心将杂质去除，不会干扰 PCR 或限制酶消化。     |
|                                         | 裂解不充分                     | 加入 Buffer MTL 后，增加孵育时间，过夜孵育可能是必要的。                     |
|                                         | 微量蛋白质污染物残留                | 步骤 8 后使用 300 μL Buffer MTL 和 300 μL 乙醇的混合液漂洗柱子在进行步骤 9。 |
| 没有 DNA 洗脱下来                             | 细胞裂解不充分                   | 加入 Buffer MTL 后，增加孵育时间，过夜孵育可能是必要的。                     |
|                                         | 没有充分均质化                   | 液氮作用下研磨样品至粉末。                                          |
|                                         | DNA Wash Buffer 内没有加入无水乙醇 | 使用前按照要求加入乙醇至 DNA Wash Buffer 内                         |
|                                         | 样本上柱前未加入无水乙醇              | 在上柱之前必须按照说明书加入 Buffer MBL 和无水乙醇。                       |

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

[www.beiwobiomedical.com](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[sales@beiwobiomedical.com](mailto:sales@beiwobiomedical.com)