

## 海洋动物基因组 DNA 分离试剂盒简明说明书 (BW-GD3311)

### 产品简介

该系统的关键是采用新的 Mini Column，它可以在特定的最佳条件下可逆吸附 DNA 或 RNA，从而去除蛋白质和其它污染物。核酸易通过去离子水或低盐缓冲液洗脱。

海洋动物 gDNA 小提试剂盒提供了一种简便、快速的基因组 DNA 分离方法，可用于 PCR 和 Southern 分析。可以很容易的一次提取至多 30 mg 的海洋动物组织，如鱼、虾、扇贝、海参。该试剂盒允许同时处理单个或多个样品，不需要苯酚/氯仿提取，也省去了耗时的步骤（例如使用异丙醇或乙醇沉淀）。纯化后的 DNA 可直接用于 PCR、Southern Blotting 和限制性酶切消化等大多数应用。

### 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 HTL	1 mL	11 mL	55 mL
Buffer HBL	1 mL	12 mL	60 mL
Buffer KB	2.1 mL	26 mL	130 mL
DNA Wash Buffer*	2 mL	15 mL	3 x 24 mL
Elution Buffer	1 mL	11 mL	52 mL
Proteinase K	110 µL	1.3 mL	5 x 1.3 mL
User Manual	1	1	1

### 要点

- DNA Wash Buffer: 加入 8 mL (BW-GD3311-00) 或 60 mL (BW-GD3311-01) 或 96 mL (BW-GD3311-02) 96-100%乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- 将 Elution Buffer 预热至 65°C。

### 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 12 个月。长期储存建议分装后存放于 -20°C。其他试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。

### 实验前需准备的材料

- 离心机
- 无菌的 1.5 mL 离心管
- 震荡水浴锅 (50°C)
- RNase A (20 mg/mL) (可选)
- 96-100%乙醇

### 操作步骤

该方法适用于从 30 mg 组织中分离基因组 DNA，产量根据样品来源而异。

**可选：**虽然没必要对组织进行机械均质化，但在液氮下粉碎样品可以增强裂解，缩短孵育时间。

1. 将 20-30 mg 的组织切碎，置于 1.5 mL 离心管内。加入 **200 µL Buffer HTL**。为了加速裂解，将组织切成碎片。

2. 加入 **25 µL Proteinase K**，涡旋混匀，在摇床水浴锅中 50°C 孵育，可有效增强裂解。若没有振荡水浴锅，可每 20-30 min 涡旋一次。

**注：**裂解时间取决于所用组织的量及类型，通常而言，平均孵育时间在 1-3 h。

3. **可选：**某些组织富含 RNA，当使用此试剂盒时可能会和 DNA 共纯化出。为此，加入 4 µL RNase A (适用于 30 mg 以下的样品)，室温孵育 2 min。

4. 12,000 ×g 离心 5 min，使得不溶性组织碎片沉淀。小心吸取上清液，转移至无菌的离心管内。

5. 加入 **220 µL Buffer HBL**，涡旋混匀，70°C 孵育 10 min。

**注：**Buffer HBL 加入后可能会形成细小的沉淀，但不影响 DNA 的回收。根据起始样品量调节 Buffer HBL 的使用量。

6. 加入 220 µL 无水乙醇 (96-100%，室温)，涡旋混匀。

**注：**根据起始样品量调节乙醇的使用量。

7. 将一个 **DNA Mini Column** 插入至一个 **2 mL Collection Tube**，将步骤 6 的整个样品 (包含可能形成的沉淀) 转移至 **Mini Column**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

8. 将 **DNA Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，加入 **500 µL Buffer KB**，10,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

9. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer**，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

10. 重复步骤 **9**。

11. 开盖，最大转速 (12,000 ×g) 离心 2 min，去除残留乙醇。

**注：**该步骤对于最佳洗脱非常必要。

12. 将 **DNA Mini Column** 置于一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **100-200 μL** 预热至 65°C 的 **Elution Buffer**，室温静置 1-3 min，12,000 ×g 离心 1 min，洗脱 DNA。

13. 可选：用 **100-200 μL** **Elution Buffer** 再次洗脱。

**注：**每 200 μL 洗脱通常可得到 60-70% 的 DNA。因此，两次洗脱可得到约 90% 的 DNA。然而，增加洗脱体积会降低最终产物的浓度。为了获得高浓度的 DNA，洗脱时可用 50-100 μL 的 **Elution Buffer**（会稍微降低 DNA 产量）。洗脱体积若低于 50 μL，会大大降低产量。在某些情况下，加入 **Elution Buffer** 后，65°C 孵育柱子（替代室温）会提高产量。

### 操作步骤（负压/离心法）

按照离心法的操作步骤进行样品的破碎、均质化和蛋白酶消化，转移样品至 DNA Mini Column，接下来的步骤用下列步骤替代：

**注：**在使用此方法时请仔细阅读前面的章节。

1. 根据制造商指南安装负压设备，将 **DNA Mini Column** 连接到负压装置上。
2. 将样品加载至 **Mini Column**。
3. 打开负压装置，允许裂解液通过柱子，关闭负压装置。
4. 加入 **500 μL Buffer KB**，打开负压装置，允许液体通过柱子。
5. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，允许液体通过柱子。关闭负压装置。
6. 重复步骤 5。
7. 将 **Mini Column** 转移至一个 **2 mL Collection Tube**，12,000 ×g 开盖离心 2 min，干燥柱子。
8. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **100~200 μL** 65°C 预热的 **Elution Buffer**，室温静置 1-2 min，

12,000 ×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

**可选：**用 100-200 μL **Elution Buffer** 再次洗脱。

### DNA 质量和浓度的确定

总 DNA 的产量可用分光光度计测定，使用去离子水、Tris-HCl 或 **Elution Buffer** 作为空白对照。DNA 浓度计算如下：

$$【DNA】=A_{260} \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (\text{稀释倍数})$$

DNA 的质量可通过在 260 nm 和 280 nm 处测得的吸光度来评估， $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7-1.9 代表 DNA 纯度在 85-95%。预估的产量根据使用样品的量及类型而变化。

通常，30 mg 的新鲜组织在二次洗脱（每次 200 μL 水或 10 mM Tris-HCl, pH8.5）后将会得到 10-40 μg 的 DNA。

### 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 HTL/Proteinase K 后，增加孵育时间。正确加入 Buffer HBL 的加入量，70°C 孵育一定的时间。若有必要，孵育时间延长 10 min。
	样品太大	若使用超过 30 mg 的组织，增加 Proteinase K, Buffer HTL 和乙醇的使用量，依次使裂解液通过柱子。
	样品太粘稠	将样品分成多个管，Buffer HTL 体积调节至 25 μL。
	样品本身 DNA 含量低	按比例增加所有试剂（Proteinase K、Buffer HTL、Buffer HBL、乙醇）的使用量和起始样品的量。将裂解液依次通过柱子。
	洗脱时增加离心	柱子上的树脂可能存在于洗脱液中。

	时间	避免离心速度过大，树脂可通过离心从洗脱液中分离，不会干扰 PCR 或限制性酶切。
低的 $A_{260}/A_{280}$ 值	加入 Buffer HBL 后由于混合不充分导致裂解不完全	重复此步骤，确保加入 Buffer HBL 后立即彻底涡旋样品。
	由于孵育不充分导致细胞裂解和蛋白降解不充分	增加 Buffer HTL 和 Proteinase K 的孵育时间，确保不留下可见的组织碎片。

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)