

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 ITL	2 mL	20 mL	90 mL
Buffer IBL	2 mL	22 mL	100 mL
Buffer KB	3 mL	26 mL	130 mL
Proteinase K	150 μ L	1.5 mL	5 x 1.3 mL
RNase A (20 mg/mL)	30 μ L	280 μ L	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入 -20°C 保存。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 (12,000 $\times$ g)
- 无核酸酶的 1.5 mL 或 2 mL 离心管
- 水浴锅
- 65°C 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 μ L Buffer ITL 和 25 μ L Proteinase K，涡旋混匀，55°C 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°C 孵育过夜将会得到较好的结果。

3. 加入 350 μ L 氯仿：异戊醇 (24:1)，涡旋 5 s 混匀，10,000 $\times$ 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 μ L Buffer ITL，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 IBL 和 5 μ L RNase A，最大速度涡旋 10 s。70°C 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 μ L 上层水相，加入 500 μ L Buffer IBL 和 500 μ L 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°C 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°C 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 A₂₆₀/A₂₈₀ 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 A₂₆₀ 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 ITL/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°C 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 ₂₆₀ /A ₂₈₀ 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 ITL 后，增加孵育时间，过夜孵育可能是必要的。
	微量蛋白质污染残留	步骤 8 后使用 300 µL Buffer ITL 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 ITL 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 IBL 和无水乙醇。
--	--------------	----------------------------------

关注微信公众号



杭州倍沃医学科技有限公司
BIOMIGA（中国）
www.beiwobiomedical.com
400-115-2855
info@biomiga.com.cn