

软体动物基因组 DNA 提取试剂盒说明书

(BW-GD2414)

Ver: 1912

产品简介

本试剂盒适用于从软体动物、节肢动物、蛔虫、扁形虫样本中高效提取基因组 DNA。亦适用于冷冻的、保存于乙醇或 DNE 溶液的组织样本，特别是福尔马林保存的材料，效果良好。

样品在高盐缓冲液中均质化并裂解，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 Mini Column 进一步被纯化。通过 wash buffer 去除蛋白质和其它杂质得到高质量的基因组 DNA。纯化后的基因组 DNA 适用于核酸内切酶消化、PCR 和低碳化技术等下游应用。

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 | 20 mL | 100 mL |
| Buffer KB | 3 mL | 26 mL | 130 mL |
| Proteinase K | 150 µL | 1.3 mL | 5 x 1.3 mL |
| RNase A (20 mg/mL) | 15 µL | 120 µL | 550 µL |
| 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-GD2414-00) 或 60 mL (BW-GD2414-01) 或 96 mL (BW-GD2414-02) 96-100%乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- 将 Elution Buffer 预热至 65°C (可分装成 0.5 mL/1 个样品)。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。Proteinase K 可在室温稳定储存一年。若要长期储存请分装后置于 -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 (至少能达到 12,000 ×g)
- 无核酸酶的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管
- 水浴锅 (65°C-70°C)
- Elution Buffer (65°C)
- 96-100%乙醇
- 氯仿: 异戊醇 (24:1)

保存于福尔马林中的无脊椎动物在操作前应先用二甲苯冲洗，然后用乙醇清洗。注：对于福尔马林固定的组织，得率通常取决于样本的年龄和大小。纯化后的 DNA 可用于 PCR 扩增，而新鲜或冷冻的样品纯化后的 DNA 可用于 southern analysis。

操作步骤

软体动物

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。按步骤 2 操作。

节肢动物 (及其他软组织无脊椎动物)

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。加入一撮白色石英砂，约 50-70 目会帮助研磨。按步骤 2 操作。

2. 加入 350 µL Buffer MTL 和 25 µL Proteinase K，涡旋混匀，65°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 µL 氯仿: 异戊醇 (24:1)，涡旋混匀 5 s，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 2 µL RNase A (20 mg/mL)，最大速度涡旋 15 s。70°C 孵育 10 min。

5. 加入 1 倍体积的 100%乙醇 (室温)，最大速度涡旋 15 s 混匀。

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 Mini Column，10,000 ×g 室温离心 1 min，弃滤液。

7. 将 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 1 min，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 1 min，弃滤液。将 Mini Column 放回 2 mL Collection Tube，打开盖子。

11. 12,000 ×g 开盖离心 2 min，除去乙醇。

12. 将 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 或 ddH₂O，室温静置 2 min，10,000 ×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 ddH₂O 稀释 10-20 倍，在 280nm 和 260nm 处测量吸光度，确定 A₂₆₀/A₂₈₀ 的值。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：

$$\text{浓度} = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times (\text{稀释倍数})$$

常见问题解答

| 问题 | 可能原因 | 建议 |
|----------|---------|------------------------------------|
| 低 DNA 得率 | 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。 |
| | 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。 |

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

