



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 μ L	1.3 mL	5 x 1.3 mL
RNase A (20 mg/mL)	15 μ L	120 μ L	550 μ L
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 $\times g$)
- 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 μ L Buffer MTL 和 25 μ L 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 μ L 氯仿：异戊醇 (24:1)，涡旋混匀 5 s，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除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 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 μ L 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 μ L 上层水相, 加入 500 μ L Buffer MBL 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 μ L** 混合液(包括可能形成的沉淀)至 **Mini Column**, 10,000 $\times g$ 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 μ L Buffer KB**, 10,000 $\times g$ 离心 30 s, 弃滤液。
9. 加入 **600 μ L DNA Wash Buffer**, 10,000 $\times g$ 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 μ L DNA Wash Buffer**, 10,000 $\times g$ 离心 1 min, 弃滤液。将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**, 打开盖子。
11. 12,000 $\times g$ 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 μ L** 预热至 65°C 的 **Elution Buffer** 或 ddH₂O, 室温静置 2 min, 10,000 $\times g$ 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 μ L 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:

浓度=50 μ g/mL x A₂₆₀ x (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

