

目 录

简介	2
原理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	3
血液类样品	
方案 1:血液 DNA 提取方案	6
方案 2:旧血 DNA 提取方案	9
方案 3:血液 DNA 快速提取方案	10
方案 4:凝血 DNA 提取方案	11
方案 5:血液黄层 DNA 提取方案	12
组织细胞类样品	
方案 6:组织 DNA 提取方案	13
方案 7:细胞 DNA 提取方案	15
方案 8:拭子 DNA 提取方案	17
方案 9:体液 DNA 提取方案	18
微生物类样品	
方案 10:酵母 DNA 提取方案	19
方案 11:细菌 DNA 提取方案	20
常见问题回答	22

版本: 2010-01

简介

SolPure DNA Kits 采用改良盐析法纯化方式，为血液样品、组织样品、培养细胞、口腔拭子，细菌等样品的基因组 DNA 提取提供一种安全而经济的解决方法。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需用到任何昂贵的试剂，是目前核酸抽提中最为经济的试剂盒。试剂盒对样品用量无限制，可灵活调节各种用量的样品。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切，Southern 杂交等实验。

- SolPure Blood DNA Kit 适合于从血液样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Tissue DNA Kit 适合于从动物组织中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Cell DNA Kit 适合于从培养细胞样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Buccal Cell DNA Kit 适合于从口腔脱落细胞，拭子中提取基因组 DNA。
- SolPure Bacterial DNA Kit 适合于从细菌样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Yeast DNA Kit 适合于从酵母或真菌样品中提取高分子量的基因组 DNA。

原理

SolPure DNA Kits 是改良的盐析法纯化方式。(血液样品在红细胞裂解液中裂解去除红细胞，离心收集白细胞)，组织、白细胞或培养细胞在裂解中裂解，DNA 释放到裂解液中，加入 RNase A 消化去除 RNA；加入高盐溶液至裂解液中盐析沉淀蛋白质和杂质；离心去除沉淀得到只含 DNA 的上清液，加入异丙醇沉淀回收 DNA；70%乙醇洗涤去除盐分，最后加入 Buffer TE 溶解 DNA。

保质期

SolPure DNA Kits 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。RNase A、Lysozyme、Lyticase、Proteinase K 和 Glycogen 室温运输，收到试剂盒后，取出 RNase A、Lysozyme、Proteinase K 和 Glycogen 并保存于 2-8℃。低温保存或运输过程中，Buffer WLB 可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。

组成

SolPure Blood DNA Kit

产品编号	D3311-01	D3311-02	D3311-03
可处理的血液体积	50 ml	300 ml	1000 ml
10 × Buffer RBC	20 ml	2 × 50 ml	400 ml
Buffer WLB	60 ml	350 ml	2 × 550 ml
Buffer PPS	20 ml	120 ml	350 ml
Buffer TE	15 ml	60 ml	200 ml
说明书	1	1	1

SolPure Tissue DNA Kit

产品编号	D3312-01	D3312-02	D3312-03
可处理的组织量	1 g	5 g	50 g
Buffer WLB	40 ml	200 ml	2 × 900 ml
Buffer PPS	15 ml	70 ml	600 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	30 ml
RNase A	5 mg	20 mg	200 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
说明书	1	1	1

SolPure Cell DNA Kit

产品编号	D3313-01	D3313-02	D3313-03
可处理的细胞数量	2×10^8	2×10^9	2×10^{10}
Buffer WLB	40 ml	300 ml	2 × 900 ml
Buffer PPS	15 ml	100 ml	600 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	30 ml
RNase A	5 mg	20 mg	200 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
说明书	1	1	1

组成

SolPure Buccal Cell DNA Kit

产品编号	D3315-01	D3315-02	D3315-03
可处理的组织量	100 Preps	500 Preps	1000 Preps
Buffer VLB	40 ml	200 ml	400 ml
Buffer PPS	15 ml	70 ml	130 ml
Glycogen Solution	60 μ l	300 μ l	600 μ l
RNase A	5 mg	20 mg	40 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1

SolPure Yeast DNA Kit

产品编号	D3322-00	D3322-01	D3322-02
处理次数	10 次	100 次	500 次
Buffer VLB	5 ml	40 ml	180 ml
Buffer PPS	2 ml	15 ml	60 ml
Lyticase	250 μ l	2.2 ml	11 ml
Buffer SE	5 ml	40 ml	180ml
RNase A	1 mg	5 mg	30 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8ml	5ml	15ml
Buffer TE	3 ml	15 ml	120 ml
说明书	1	1	1

SolPure Bacterial DNA Kit

产品编号	D3314-01	D3314-02	D3314-03
处理次数	100 次	500 次	2000 次
Buffer VLB	80 ml	350 ml	3 x 500ml
Buffer PPS	30 ml	120 ml	500 ml
Lysozme	120 mg	600 mg	4 x 600 mg
RNase A	5 mg	20 mg	100 mg
Buffer TE	30 ml	200 ml	500 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 70%乙醇
- 异丙醇
- 灭菌的 1.5ml 离心管，或 15ml 离心管，或 50ml 离心管
- $15,000 \times g$ 小型离心机，或适合 15ml/50ml 离心管的离心机($2,000 \times g$)
- 用灭菌水把 10 × Buffer RBC 稀释成 1 × Buffer RBC，并于室温保存。
- Lysozyme 的配制(50mg/ml): Lysozyme 以干粉提供，使用前须加入适量的 Buffer TE 溶解，使其终浓度为 50mg/ml。溶解后，分装保存于 2-8℃。
- 溶解 Lyticase (5U/μl): 加入 Buffer SE 溶解 Lyticase 至终浓度为 5U/μl。Lyticase 干粉在 2-8℃保存一年，但溶解的 Lyticase 须保存于 2~8℃。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃保存一年，溶解的 Proteinase K 须保存于-20℃。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 或 Buffer AE 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml，颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存，但溶解的 RNase A 须保存于-20℃。

方案 1. 血液和骨髓 DNA 提取(D3311)

该方案适合于从★300 μ l, ■3ml 或◆10ml, 或其它体积的抗凝全血和骨髓样品中提取高分子量基因组 DNA, 按下表的比例加入各种试剂。

血液体积	300 μ l	400 μ l	500 μ l	1ml	2ml	3ml	10ml
1 x Buffer RBC	900 μ l	1.2ml	1.5ml	3ml	6ml	9ml	30ml
Buffer WLB	300 μ l	400 μ l	500 μ l	1ml	2ml	3ml	10ml
Buffer PPS	100 μ l	133 μ l	167 μ l	333 μ l	667 μ l	1ml	3.3ml
异丙醇	300 μ l	400 μ l	500 μ l	1ml	2ml	3ml	10ml
70%乙醇	300 μ l	400 μ l	500 μ l	1ml	2ml	3ml	10ml
Buffer TE	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l	200 μ l	250 μ l	1ml

裂解红细胞

1. 吸取★900 μ l 1 x Buffer RBC 至 1.5ml 离心管; ■9ml 1 x Buffer RBC 至 15ml 离心管; 或 ◆30ml 1 x Buffer RBC 至 50ml 离心管中。
注: 10 x Buffer RBC 使用前须用灭菌水稀释 10 倍。
2. 加入★300 μ l、■3ml、或 ◆10ml 全血或骨髓样品至装有 1 x Buffer RBC 的离心管中, 颠倒 10-15 次混匀。
3. **室温放置★1 分钟、■5 分钟、或◆5 分钟**, 期间颠倒混匀 2-3 次。
注: 处理 1 小时前采取的血样时, 需放置 3 分钟以上, 以确保红细胞充分裂解。
4. ★13,000 \times g 离心 1 分钟, ■2,000 \times g 离心 5 分钟, ◆2,000 \times g 离心 5 分钟。
5. 倒弃或吸弃上清液, 剩余★~30 μ l, ■~200 μ l, 或◆~200 μ l 溶液和白细胞沉淀。

裂解白细胞

6. 剧烈涡旋让白细胞沉淀在残液中充分分散。
7. **加入★300 μ l, ■3ml, 或 ◆10ml Buffer WLB 至白细胞重悬液中**。立即用移液枪

吸打或剧烈涡旋 30 秒裂解细胞。若吸打或涡旋后有团状物，37℃水浴 1-2 小时使之溶解。

去除 RNA 污染

8. (可选) 若需去除 RNA，加入★1.5 μ l，■15 μ l，或◆50 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀，37℃温育 15-60 分钟。冰上放置★1 分钟，■3 分钟，或◆3 分钟冷却样品。

去除蛋白质

9. 加入★100 μ l，■1ml，或◆3.33ml Buffer PPS，最高速度涡旋混匀 30 秒。
10. ★13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟，■2,000 \times g 离心 5 分钟，或 ◆2,000 \times g 离心 5 分钟。
注：离心后会形成紧密的蛋白沉淀。若沉淀不紧密，以最快速度涡旋混匀 30 秒，冰上放置 5 分钟。重复此步离心去除蛋白质。

沉淀 DNA

11. 吸取★300 μ l 异丙醇至 1.5ml 离心管中；或■3ml 异丙醇至 15ml 离心管中；或◆10ml 异丙醇至 50ml 离心管中。
12. 把第 10 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
13. ★13,000-16,000 \times g 离心 3 分钟，■2,000 \times g 离心 5 分钟，或 ◆2,000 \times g 离心 5 分钟。
14. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。

乙醇脱盐和干燥

15. 加入★300 μ l，■3ml，或◆10ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒或涡旋洗涤 DNA 沉淀。
16. ★13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟，■2,000 \times g 离心 5 分钟，或 ◆2,000 \times g

离心 5 分钟。

17. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
18. 空气干燥★5 分钟，■5 分钟，或◆15 分钟。

溶解 DNA

19. 加入★100 μ l，■250 μ l，或◆1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀团中。涡旋 5 秒。65 $^{\circ}$ C 温育★30 分钟，■1 小时，或◆1 小时溶解 DNA。
20. 室温或 2-8 $^{\circ}$ C 放置过夜使 DNA 充分溶解。把 DNA 保存于 2-8 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

方案 2:血液 DNA 快速抽提方案(D3311)

该方案是专门为处理 10ml 血液样品 DNA 提取优化的方案，它能更加高效快速地从血液样品提取 DNA。该方案也可以适当调节溶液用量来处理其它体积的血液样品。

1. 吸取 30ml 1 × Buffer RBC 至 50ml 离心管中。
注：10 × Buffer RBC 使用前须用灭菌水稀释 10 倍。
2. 转移 10ml 血液样品至装有 RBC 的离心管中。颠倒混匀 10 次，室温静置 5 分钟，其间颠倒混匀 2-3 次。
3. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀白细胞。倒弃上清液，反扣于吸水纸吸尽残液。(注意不要丢失白细胞沉淀)
4. **加入 3.33ml Buffer PPS 至白细胞沉淀中**，最快速度涡旋 30 秒重悬白细胞。
5. **加入 10ml Buffer WLB 至样品中**。最快速度涡旋混匀 2 分钟。
6. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀去除蛋白质。
7. 转移 10ml 异丙醇至 50ml 离心管中。
8. 把第 6 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
9. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀 DNA。
10. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。
11. **加入 10ml 70%乙醇**，颠倒洗涤 DNA 沉淀。
12. 2,000 × g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。**空气干燥 10 分钟**。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
14. 加入 1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。65℃温育 1 小时溶解 DNA。
15. 室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 3: 旧血样品的 DNA 提取(D3311)

血液在室温(15-25°C)超过 24 小时, 或 2-8°C 放置时间超过 5 天后, 血液样品中可能会出现溶血现象或会存在凝固的小块, 最好采用该方案进行操作, 以提高 DNA 的产量。该方案也可以适当调整处理其它体积的血液样品。

1. 吸取 30ml 1 x Buffer RBC 至 50ml 离心管中。**加入 10ml 全血样品至离心管中。**颠倒混匀 10 次。室温静置 5 分钟, 期间颠倒混匀 2-3 次。
2. 2,000 x g 离心 5 分钟。小心吸弃上清液, 剩余 3.5ml 上清液和沉淀。
3. 涡旋让沉淀在残液中充分重悬。
4. **加入 10ml Buffer WLB 至重悬液中。**涡旋混匀 30 秒。37°C 水浴 2 小时或过夜, 以确保细胞的充分裂解。
5. 加入 50µl RNase A, 颠倒混匀 10 次。37°C 水浴 15-60 分钟。
6. 冰上放置 5 分钟冷却样品。
7. **加入 4.5ml Buffer PPS 至裂解液中。**最高速度涡旋 30 秒。
8. 2,000 x g 离心 10 分钟。
9. 吸取 13.5ml 异丙醇至 50ml 离心管。
10. 小心把第 8 步的上清液倒入离心管中。颠倒离心管 30-50 次。2,000 x g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。
12. 加入 10ml 70%乙醇至 DNA 沉淀团。颠倒混匀。2,000 x g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。空气干燥 10 分钟。
14. 加入 500µl Buffer TE 至 DNA 沉淀团中。涡旋 5 秒。
15. 65°C 温育 1 小时溶解 DNA, 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 4: 凝固血液 DNA 抽提(D3311)

该方案适合于从◆50 μ l 或■1ml 凝固的血液中提取 DNA。该方案需另外准备一管 Proteinase K(20mg/ml)。

1. 转移◆50 μ l 凝血样品和 550 μ l Buffer WLB 至◆1.5ml 离心管中; 或转移■1ml 凝血样品和 11ml Buffer WLB 至 50ml 离心管中。
2. 加入◆3 μ l, 或■60 μ l Proteinase K (20mg/ml)至样品中。颠倒 15 次。
3. 55 $^{\circ}$ C 振荡水浴 3 小时至过夜, 或直至所有颗粒都完全消化。
4. 加入◆3 μ l 或■60 μ l RNase A 至样品中。颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟冷却裂解液。
6. 加入◆200 μ l, 或■4ml Buffer PPS 至裂解液中。最快速度涡旋 30 秒, 冰上放置 10 分钟。
7. ◆ 13,000-16,000 \times g 离 3 分钟, 或■2,000 \times g 离心 10 分钟。
8. 吸取◆600 μ l 异丙醇和 1 μ l Glycogen(20mg/ml)至 1.5 ml 离心管中; 或■12ml 异丙醇和 20 μ l Glycogen(20mg/ml)至 50ml 离心管中。
9. 把第 7 步的上清液转移至装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。
10. ◆ 13,000-16,000 \times g 离心 5 分钟, 或■ 2,000 \times g 离心 10 分钟沉淀 DNA。
11. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。
12. 加入◆600 μ l 或■12ml 70%乙醇至样品中。颠倒混匀数次。
13. ◆ 13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟, 或■2,000 \times g 离心 5 分钟。
14. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。空气干燥◆ 10 分钟或■15 分钟。
15. 加入◆20 μ l 或■0.4ml Buffer TE 至 DNA 沉淀。涡旋 5 秒。65 $^{\circ}$ C 温育◆ 30 分钟或■1 小时溶解 DNA。室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 5: 血液黄层 DNA 提取(D3311)

该方案适合于从血液黄层样品(Buffy Coat)中提取基因组 DNA。

血液黄层(Buffy Coat)及其制备

1. 取抗凝血液至合适的离心管中。室温下(15-25°C), 1100 × g 离心 10 分钟后, 形成明显的三层结构: 澄清的上层液为血浆, 中间层就是血液黄层(Buffy Coat), 含浓缩的淋巴细胞, 而最下层则为富集的红细胞。血液黄层含有浓缩的淋巴细胞, 相同体积的血液黄层的 DNA 产量是血液的 5-10 倍。转移 0.1-0.2 倍的黄层样品至新的离心管中。(举例: 3ml 抗凝血液可获得 300-600µl 的血液黄层)
2. 冻藏的血液黄层(Buffy Coat)样品须于 37°C 振荡水浴快速解冻。解冻后放置于冰上等待使用。

红细胞的去除

3. 吸取 150-300µl 血液黄层至 15ml 离心管中。加入 3 倍体积 1 × Buffer RBC 至样品中。颠倒混匀 5-10 次。室温放置 10 分钟, 期间颠倒混匀 2-3 次。
注: 试剂盒提供 10 × Buffer RBC, 使用前必须用灭菌水稀释 10 倍才能使用。
4. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀白细胞。小心倒弃或吸弃上清液, 剩余~200µl 残液和细胞沉淀。

裂解和纯化

5. 剧烈涡旋 15 秒让白细胞在残液中充分重悬。
6. **加入 3ml Buffer WLB 至细胞重悬液中。**立即用移液枪吸打几次或剧烈涡旋 30 秒。若吸打或涡旋后还有细胞团块, 37°C 温育 2 小时使之消失。
7. 加入 15µl RNase A 至裂解液中。颠倒 25 次混匀。37°C 温育 15-60 分钟。冰上放置 3 分钟冷却样品。
8. **加入 1ml Buffer PPS 至裂解液中。**最高快速度涡旋混匀 30 秒。
9. 2,000 × g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。
10. 吸取 3ml 异丙醇至 15ml 离心管中。

11. 小心把第 9 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
12. 2,000 × g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残液。
14. 加入 3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀数次。
15. 2,000 × g 离心 5 分钟。
16. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥 10 分钟。
17. 加入 250μl Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。65℃温育 1 小时溶解 DNA。
18. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 6. 动物组织 DNA 提取(D3312)

该方案适合于从各种动物组织样品中提取高分子量基因组 DNA。根据下表调整试剂用量就可以处理不同用量的组织。

溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml。溶解的 Proteinase K 须保存于-20℃，保质期为一年。

组织用量	10mg	20mg	30mg	50mg	100mg
Buffer WLB	300µl	600µl	900µl	1.5ml	3ml
Proteinase K	1.5µl	3µl	4.5µl	7.5µl	15µl
RNase A	1.5µl	3µl	4.5µl	7.5µl	15µl
Buffer PPS	100µl	200µl	300µl	500µl	1ml
异丙醇	300µl	600µl	900µl	1.5ml	3ml
70%乙醇	300µl	600µl	900µl	1.5ml	3ml
Buffer TE	100µl	200µl	300µl	500µl	1ml

- 剪取◆ 5-10mg, 或■ 50-100mg 动物组织, 用液氮将样品研磨成粉末状。把样品转移至 1.5ml 离心管或 15ml 离心管中。
除液氮研磨外, 其它匀浆方法, 如玻璃匀浆器匀浆, 一次研磨杵等都可以使用, 对于富含多糖类物质海洋生物样品, 样品量不要超过◆ 5mg 或■ 50mg。
- 加入◆ 300µl 或■ 3ml Buffer WLB 至装有样品的离心管中。颠倒混匀。
- 加入◆ 2µl 或■ 20µl Proteinase K 至裂解液中。颠倒混匀, 55℃水浴 1~3 小时或直至组织样品完全消化。
- 加入◆ 2µl 或■ 20µl RNase A 至裂解液中。颠倒混匀, 37℃水浴 15~60 分钟。
- 冰上放置 3 分钟冷却样品。
- 加入◆ 100µl 或■ 1ml Buffer PPS 至裂解液中。最高速度涡旋 30 秒。
对于富含多糖类物质海洋生物样品, 样品涡旋混匀后, 冰上静置 15 分钟让杂质更充分析出。
- ◆ 13,000-16,000 × g 离 3 分钟, 或■ 2,000 × g 离心 10 分钟。

8. 吸取◆300 μ l 异丙醇至 1.5ml 离心管；或■3ml 异丙醇至 15 离心管中。
9. 把第 7 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
10. ◆ 13,000-16,000 \times g 离心 3 分钟，或■ 2,000 \times g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。
12. 加入◆300 μ l 或■3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀数次。
13. ◆13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟，或■2,000 \times g 离心 3 分钟。
14. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥◆10 分钟或■15 分钟。
15. 加入◆100 μ l 或■1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
16. 65 $^{\circ}$ C 温育 1 小时溶解 DNA。
17. 室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 7: 培养细胞 DNA 提取(D3313)

该方案适合于从◆ $1-2 \times 10^6$, 或■ $1-2 \times 10^7$ 个培养细胞中提取高分子量基因组 DNA。

溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 *Protease Dissolve Buffer* 至 *Proteinase K* 干粉中至终浓度为 20mg/ml。溶解的 *Proteinase K* 须保存于 -20°C , 保质期为一年。

1. 收集细胞

a). 悬浮培养细胞: 计算细胞数量, 按第 2 步进行操作。

b). 贴壁培养细胞: 计算细胞数量, 采用胰酶消化或用细胞刮收集细胞。

胰酶处理: 吸弃培养液, 用 PBS 洗涤细胞, 然后加入含 0.1-0.25% 胰酶(trypsin)的 PBS。当细胞完全脱落后, 按第 2 步进行操作;

细胞刮: 用细胞刮把细胞从培养瓶或培养皿刮下, 然后按第 2 步进行操作;

2. 转移含◆ $1-2 \times 10^6$ 或■ $1-2 \times 10^7$ 个细胞培养液或胰酶消化液至◆1.5ml 离心管或■15ml 离心管中。
3. ◆13,000-16,000 \times g 离心 5 秒, 或■500 \times g 离心 5 分钟收集细胞。
4. 小心吸弃或倒弃培养液, 剩余◆~20 μ l 或■~200 μ l 液体和细胞。
5. 剧烈涡旋或用移液枪吸打, 使细胞在残液中充分重悬分散。
6. 加入◆300 μ l 或■3ml Buffer WLB 至重悬细胞中。最高速度涡旋 10 秒或用移液枪吸打混匀 5~10 次。
7. 加入◆2 μ l 或■20 μ l Proteinase K 至裂解液中。颠倒混匀, 55°C 水浴 30~60 分钟。
8. 加入◆2 μ l 或■20 μ l RNase A 至裂解液中。混匀, 37°C 水浴 20 分钟。
9. 冰上放置 3 分钟冷却样品。
10. 加入◆100 μ l 或■1ml Buffer PPS 至裂解液中。最快速度涡旋 20 秒。
11. ◆13,000-16,000 \times g 离 5 分钟, 或■2,000 \times g 离心 10 分钟。
12. 吸取◆300 μ l 异丙醇至 1.5ml 离心管; 或■3ml 异丙醇至 15 离心管中。
13. 把第 10 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直

至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。

14. ◆ 13,000-16,000 × g 离心 3 分钟，或 ■ 2,000 × g 离心 10 分钟。
15. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。
16. **加入◆300µl 或■3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。**颠倒混匀数次。
17. ◆13,000-16,000 × g 离心 1 分钟，或 ■2,000 × g 离心 3 分钟。
18. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥◆10 分钟或■15 分钟。
19. **加入◆100µl 或■1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。**涡旋 5 秒。
20. 65℃温育 1 小时溶解 DNA。
21. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 8. 拭子 DNA 提取(D3315)

该方案适合于从 1 个口腔拭子中提取 DNA。

1. 收集口腔细胞：用拭子在口腔内来回刮 10 次；(取样前 1 小时内最好不要吃喝)
2. **加入 300 μ l Buffer WLB 至 1.5ml 离心管中。**用剪刀或镊子把拭子的头部转移至离心管中。
3. 选择一种方法来裂解样品：
 - a). 65 $^{\circ}$ C 水浴 15-60 分钟；
 - b). 最高产量：加入 1.5 μ l Proteinase K 至裂解液中。颠倒混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。
4. 加入 1.5 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 15-60 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟；取出拭子，并在离心管边缘挤压以尽量回收溶液，去除拭子。
6. **加入 100 μ l Buffer PPS 至裂解液中。**高速涡旋 20 秒，冰上放置 5 分钟。
7. 13,000-16,000 \times g 离 3 分钟。
8. **吸取 300 μ l 异丙醇和 0.5 μ l 糖原(Glycogen)至新的 1.5ml 离心管中，**把第 7 步获得的上清液倒入离心管中。
9. 颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。13,000-16,000 \times g 离心 5 分钟。
10. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
11. 加入 300 μ l 70%乙醇至沉淀中。混匀，13,000-16,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上。空气干燥 5 分钟。
13. 加入 20 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
14. 65 $^{\circ}$ C 温育 10-30 分钟溶解 DNA。

方案 9: 体液 DNA 抽提(D3315)

该方案适合于从◆ 50 μ l 或■ 1ml 体液(如唾液, 血清, 尿液, 全血, 奶汁)中提取 DNA。

1. 加入◆ 550 μ l Buffer VLB 至◆ 1.5ml 离心管中, 或加入■ 5ml Buffer VLB 至 15ml 离心管中。
2. 转移◆ 50 μ l 或■ 1ml 体液样品至装有裂解液的离心管中。
3. 加入◆ 1.5 μ l 或■ 15 μ l Proteinase K 至裂解液中。混匀, 55°C 水浴 1-3 小时。
4. 加入◆ 1.5 μ l 或■ 15 μ l RNase A 至裂解液中。混匀, 37°C 水浴 15 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟冷冻样品。
6. 加入◆ 200 μ l 或■ 2ml Buffer PPS 至裂解液中。涡旋 30 秒, 冰上放置 5 分钟。
7. ◆ 13,000-16,000 \times g 离 3 分钟, 或■ 2,000 \times g 离心 10 分钟。
8. 吸取◆ 600 μ l 异丙醇和 0.5 μ l Glycogen 至 1.5ml 离心管; 或■ 6ml 异丙醇和 10 μ l Glycogen 至 15ml 离心管中。
9. 把第 7 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。
10. ◆ 13,000-16,000 \times g 离心 5 分钟, 或■ 2,000 \times g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液, 并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。
12. 加入◆ 600 μ l 或■ 6ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀几次。
13. ◆ 13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟, 或■ 2,000 \times g 离心 3 分钟。
14. 小心倒弃上清液, 并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。空气干燥◆ 10 分钟, 或■ 15 分钟。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
15. 加入◆ 20 μ l, 或■ 0.1ml Buffer TE(10Mm Tris, pH8.0), 涡旋 5 秒。65°C 温育◆ 30 分钟, 或■ 1 小时溶解 DNA。
16. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 10. 酵母 DNA 提取(D3322)

该方案适合于从 1ml 培养过夜的酵母培养液($1\sim 2 \times 10^8$)中提取酵母基因组 DNA。

- **溶解 Lyticase (5U/ μ l): 加入 Buffer SE 至 Lyticase 干粉中至终浓度为 5U/ μ l。溶解的 Lyticase 须保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 保质期为一 年。**
 - **2-巯基乙醇**
1. 准备过夜培养的酵母培养液, 约含 $1\sim 2 \times 10^8$ 个酵母细胞。
 2. 转移 1ml 酵母培养液至 1.5ml 离心管。
 3. 13,000~16,000 \times g 离心 10~15 秒收集酵母细胞。
 4. 加入 300 μ l Buffer SE、10 μ l 2-巯基乙醇和 20 μ l Lyticase(5U/ μ l)至酵母细胞中。用移液枪吸打几次重悬酵母细胞, 37 $^{\circ}$ C 温育 30~60 分钟。
 5. 13,000~16,000 \times g 离心 60 秒收集酵母原生质体, 小心倒弃或吸弃溶液。
 6. 加入 300 μ l Buffer WLB 和 1.5 μ l RNase A 至原生质体。最高速度涡旋 20 秒或用移液枪吸打混匀 5~10 次, 65 $^{\circ}$ C 静置 15~30 分钟。
 7. 冰上放置 3 分钟。加入 100 μ l Buffer PPS 至裂解液中。高速涡旋 20 秒。
 8. 13,000-16,000 \times g 离 3 分钟。
 9. 吸取 300 μ l 异丙醇至新的 1.5ml 离心管中, 把第 8 步获得的上清液倒入离心管中。
 10. 颠倒离心管 30~50 次, 13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟。
 11. 小心倒弃上清液, 并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
 12. 加入 300 μ l 70%乙醇至沉淀中。混匀, 13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟。
 13. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸上。空气干燥 5 分钟。
 14. 加入 100 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
 15. 65 $^{\circ}$ C 温育 10~30 分钟溶解 DNA。

16. (可选) 高分子量基因组 DNA)室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 11: 细菌 DNA 提取(D3314)

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 细菌中提取 DNA。更多数量的细菌也可以使用, 只需相应地扩大各种试剂的用量即可。

Lysozyme 的配制(10mg/ml): Lysozyme 以干粉提供, 使用前须加入适量的 Buffer TE 溶解, 使其终浓度为 10mg/ml。溶解后, 分装保存于 2-8°C。

1. 样品的裂解

A. 革兰氏阴性细菌的裂解

A1. 转移 0.5ml 细菌培养液($<1.5 \times 10^9$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中;

A2. 13,000-16,000 \times g 离心 30 秒收集细菌; 小心倒弃上清液;

A3. 加入 600 μ l Buffer WLB, 涡旋或吸打重悬细菌;

A4. 80°C 水浴 10 分钟裂解细菌;

A5. 其余按第 2 步进行操作。

B. 革兰氏阳性细菌的裂解

B1. 转移 0.5ml 细菌培养液($<1.5 \times 10^9$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中。

B2. 13,000-16,000 \times g 离心 30 秒收集细菌; 小心倒弃上清液。

B3. 加入 100 μ l Buffer TE/Lysozyme。涡旋重悬细菌, 37°C 水浴 20 分钟消化细胞壁。

B4. 加入 500 μ l Buffer WLB 至样品中, 涡旋重悬细菌。

(可选)处理结核分杆菌、葡萄球菌或其它难裂解细菌时, 可加入 10 μ l Proteinase K (20mg/ml, 另外订购)至裂解液中, 颠倒混匀后, 65°C 水浴 20 分钟消化去除细胞壁。

B5. 80~90°C 水浴 20 分钟裂解细菌。

B6. 其余按第 2 步进行操作。

2. 加入 3 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。
3. 冰上放置 3 分钟冷冻样品。
4. **加入 200 μ l Buffer PPS 至裂解液中**，最快速度涡旋 30 秒。
5. 13,000-16,000 \times g 离 3 分钟。
6. **吸取 600 μ l 异丙醇至新的 1.5ml 离心管中**。
7. 把第 5 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30~50 次。
8. 13,000-16,000 \times g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
9. **加入 600 μ l 70%乙醇至 DNA 沉淀中**，颠倒数次洗涤 DNA 沉淀。
10. 13,000-16,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液，空气干燥 10 分钟。
12. 加入 50~100 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒，65 $^{\circ}$ C 温育 1 小时溶解 DNA。
13. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
产量低或纯度低	
细胞没有充分裂解	加入 Buffer WLB 之前，必须涡旋让细胞沉淀团在残液中充分重悬。加入 Buffer WLB 后，吸打或涡旋后，细胞沉淀团还没有消失，用移液枪吸打 10-15 次或在 37°C 水浴 10-60 分钟至沉淀团消失。
加入异丙醇后混匀不充分	加入异丙醇后，须颠倒混匀 30-50 次，或直至看到丝状的沉淀。
DNA 沉淀丢失	在倒弃上清液时，DNA 沉淀团被倒掉
蛋白质沉淀不完全	加入 PPS Solution 后，必须高速涡旋 20 秒，让蛋白质充分沉淀。
蛋白质沉淀被吸出	蛋白质沉淀不紧密，重复涡旋 20 秒，冰上放置 5 分钟，再离心去除蛋白质沉淀。
DNA 溶解不充分	室温或 2-8°C 过夜让 DNA 充分溶解，其间偶尔颠倒混匀加速 DNA 的溶解。

Note: