

MolPure® Blood/Cell/Tissue/Bacteria DNA fast Kit

通用全血/细胞/组织/细菌 DNA 快速提取试剂盒

产品简介

MolPure® Blood/Cell/Tissue/Bacteria DNA fast Kit 通用全血/细胞/组织/细菌 DNA 快速提取试剂盒采用独特的裂解液迅速裂解细胞，利用硅胶膜离心柱特异地吸附 DNA，无需酚氯仿等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，最大限度的去除蛋白及其他抑制性杂质。适用于从多种材料(全血、动物组织细胞、鼠尾、大肠杆菌等)中高效地提取基因组 DNA。提取的 DNA 可直接用于酶切、PCR、Southern Blot、病毒检测等实验。

产品信息

货号	18701ES50/18701ES70
规格	50 T/200 T

组分信息

类别	组分编号	组分名称	18701ES50	18701ES70
Part I	18701-A	平衡液	5 mL	20 mL
	18701-B	裂解液 LB	11 mL	40 mL
	18701-C	结合液 BD	15 mL	60 mL
	18701-D	去蛋白液 PL*	16 mL	64 mL
	18701-E	漂洗液 WB*	13 mL	50 mL
	18701-F	洗脱缓冲液 EB	15 mL	20 mL
	18701-G	收集管 (2mL)	50 个	200 个
	18701-H	吸附柱 AC	50 个	200 个
Part II	18701-I	蛋白酶 K 溶液	1 mL	1mL×4 支

储存条件

Part I，室温保存，有效期为 1 年。

Part II，蛋白酶 K，2~8°C 保存，有效期为 1 年。

注意事项

1. 该试剂盒适配的样本 ≤200 μL 无核新鲜或冻存的抗凝全血；5-20 μL 有核新鲜或冻存的抗凝全血；5×10^6 个培养细胞；50 mg 动植物组织；2×10^9 个细菌。
2. 所有的离心均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。
3. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4°C 存放少于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
4. 注意观察各溶液是否有析出或浑浊（尤其冬季等室温为低温环境时），可 37°C 温浴复溶至溶液澄清，避免影响使用效果。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

6. 本产品仅作科研用途!

使用说明

使用前准备

1. 需要自备乙醇, 异丙醇, 1× PBS (磷酸盐缓冲液, 可选), RNase A (10406ES) (可选), 溶菌酶 (10402ES) (用于革兰氏阳性菌, 可选)
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70°C 备用。
3. 平衡硅胶膜柱子: (临用前才预处理) 取一个新的吸附柱装在收集管中, 吸取 100 μL 的**平衡液**至柱子中。13000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。接后续的操作步骤。**此项为必做项!**
4. 第一次使用前请先在**去蛋白液 PL** 中加入指定量无水乙醇(50T/200T 分别加入 10 mL/40 mL 无水乙醇); **漂洗液 WB** 中加入指定量无水乙醇 (50 T /200T 分别加入 52 mL/200mL 无水乙醇), 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!

操作方法

一、样本预处理

1. 全血

a. 取 200 μL 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液, 放入 1.5 mL 离心管。

- ◆ 如果全血起始量小于 200 μL, 则用 1×PBS 补足到 200 μL。如果起始量介于 200 μL -300 μL 之间, 则后续操作需要按照比例增加试剂用量。
- ◆ 如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液, 其红细胞为有核细胞, 因此处理量仅用 5-20 μL, 可加 1×PBS 补足到 200 μL 后进行后续步骤。

b. 加入 20 μL **蛋白酶 K** 溶液, 充分混匀, 再加入 200 μL **结合液 BD**, **立刻涡旋振荡充分混匀**, 在 70°C 放置 10 min。溶液应变清亮 (但颜色偏黑色)。

可选步骤: 如果 RNA 残留较多, 需要去除 RNA, 可以在加入 200 μL 结合液 BD 前加 5 μL 100 mg/ mL RNase A (10406ES) 溶液, 振荡混匀, 室温放置 5 - 10 min。

c. 冷却后加 100 μL **异丙醇** (也可以用无水乙醇替代, 以下同), **立刻涡旋振荡充分混匀**, 此时可能会出现絮状沉淀。

- ◆ 上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量, 必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 s 混匀。

d. 将上一步混合物(包括可能的沉淀)都加入一个**吸附柱 AC** 中, (吸附柱放入收集管中) 13, 000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。

e. 接操作步骤项下 6。

2. 组织培养细胞

a. 收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个 1.5 mL 离心管; 对于贴壁细胞, 应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b. 13, 000 rpm 离心 10 s, 使细胞沉淀下来。吸弃上清, 留下细胞团。

c. 加 200 μL 1×PBS 重悬洗涤细胞, 13, 000 rpm 离心 10 s, 使细胞沉淀下来。完全吸弃上清, 将细

胞沉淀重悬于 180 μ L 1 \times PBS 中。

d. 加入 20 μ L **蛋白酶 K** 溶液，充分混匀，再加入 200 μ L **结合液 BD**，立刻涡旋振荡充分混匀，在 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μ L 结合液 BD 前加 5 μ L 100 mg/mL RNase A (10406ES) 溶液，振荡混匀，室温放置 5 - 10 min。

e. 冷却后加 100 μ L **异丙醇**，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个**吸附柱 AC**中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤项下 6。

3. 动物组织

a. 将 20 - 50 mg 新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有 180 μ L **组织裂解液 LB** 的 1.5 mL 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ L **蛋白酶 K** 溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴 1-3 h 或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 5 μ L 100 mg/mL RNase A (10406ES) 溶液，振荡混匀，室温放置 5 - 10 min。

d. 加入 200 μ L **结合液 BD**，立刻涡旋振荡充分混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

e. 冷却后加 100 μ L **异丙醇**，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个**吸附柱 AC**中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

◆ 如果有不溶组织物可能堵住吸头，可将吸头在吸水纸上轻蹭去除不溶物；如果吸上来的混合物少则可以将吸头和不溶物一起弃去，该做法是为了去除不溶物，以免堵塞离心柱。

g. 接操作步骤项下 6。

4. 动物组织（鼠尾）

a. 将 0.2 - 0.5 cm 的鼠尾巴尖（即 20 - 50 mg）剪碎（一定要剪 0 - 2cm 范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好），或者在液氮中研磨成细粉后，转入装有 180 μ L **组织裂解液 LB** 的 1.5 mL 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ L **蛋白酶 K** 溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 将裂解物放置在 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 h 或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 5 μ L 100 mg/mL RNase A (10406ES) 溶液，振荡混匀，室温放置 5 - 10 min。

d. 可选做：用剪大口径的吸头抽打裂解物 2-3 次帮助裂解。

e. 加入 200 μ L **结合液 BD** 和 100 μ L **异丙醇**，立刻涡旋振荡充分混匀。

◆ 上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以

涡旋振荡 15 s 混匀。

f. 13,000 rpm 离心 5 min, 将上清加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。

g. 接操作步骤项下 6。

5. 细菌

a. 取 0.5-2 mL 培养菌液 (最多不超过 2×10^9 个细胞), 10,000 rpm, 离心 30 s, 尽可能的吸弃上清, 收集菌体。

◆ 起始处理量可以根据细菌密度、细胞种类、预期产量进行调整, 但是离心吸附柱最大吸附能力是 30 μ g 基因组 DNA, 如果菌体过量超过最大吸附能力, 反而会严重降低产量。

b. 加入 200 μ L 1 \times PBS 重悬, 10,000 rpm 离心 30 s, 吸弃上清。将细胞振荡或者吹打充分重悬于 180 μ L 1 \times PBS 中。

◆ 注意: 对于较难破壁的革兰氏阳性菌, 可略过 b 步骤, 加入溶菌酶进行破壁处理, 具体方法为: 加入 180 μ L 浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶(10402ES 溶菌酶必须用溶菌酶干粉溶解在缓冲液中进行配制, 否则会导致溶菌酶无活性), 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 以上。

c. 加入 20 μ L 蛋白酶 K 溶液, 充分混匀, 再加入 200 μ L 结合液 BD, 立刻涡旋振荡充分混匀, 在 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多, 需要去除 RNA, 可以在加入 200 μ L 结合液 BD 前加 5 μ L 100 mg/mL RNase A (10406ES)溶液, 振荡混匀, 室温放置 5 - 10 min。

d. 冷却后加 100 μ L 异丙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。

e. 将上一步混合物 (包括可能有的沉淀) 加入一个吸附柱 AC 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。

f. 接操作步骤项下 6。

二、DNA 提取

6. 加入 500 μ L 去蛋白液 PL (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。

7. 加入 600 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。

8. 重复步骤 7 一遍。

9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100 μ L 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 80-100 $^{\circ}$ C 水浴中预热可以提高产量), 室温放置 3-5 min, 13,000 rpm 离心 1 min。

◆ 可将第一次洗脱所得溶液重新加入离心柱中, 室温放置 2 min, 13,000 rpm 离心 1 min。可以提高浓度 10% 左右。

◆ 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 50 μ L, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少 DNA 产量。

11. DNA 可以存放在 -20 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -70 $^{\circ}$ C。