

版本号: DP150612

Magnetic Animal Tissue Genomic DNA Kit

磁珠法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒

目录号: DP341

产品内容

产品组成	DP341-01 (50 preps)	DP341-02 (200 preps)	DP341-03 (1000 preps)
组织消化液 GHA (Buffer GHA)	12 ml	50 ml	5 × 50 ml
缓冲液 GHB (Buffer GHB)	20 ml	80 ml	5 × 80 ml
缓冲液 GDA (Buffer GDA)	25 ml	90 ml	5 × 90 ml
漂洗液 PWD (Buffer PWD)	20 ml	2 × 40 ml	5 × 2 × 40 ml
Proteinase K	1 ml	4 × 1 ml	5 × 4 × 1 ml
磁珠悬浮液 G (MagAttract Suspension G)	2 × 1 ml	6 × 1 ml	5 × 6 × 1 ml
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml	60 ml	5 × 60 ml

选配试剂

RNase A (100 mg/ml) (目录号: RT405-12)

储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25℃) 干燥条件下, 可保存 12 个月, 更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃ 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在 37℃ 水浴中孵育 10 min, 以溶解沉淀。

产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，从动物组织样品中分离纯化高质量基因组DNA。独特包埋的磁珠在一定条件下对核酸具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠会释放吸附的核酸，从而达到快速分离纯化核酸的目的。整个过程不涉及有机试剂，安全、便捷，提取的基因组DNA片段大，纯度高，质量稳定可靠，尤其适合高通量工作站的自动化提取。

使用本试剂盒纯化的 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、荧光定量 PCR、文库构建、Southern 杂交、芯片检测和高通量测序等实验。

产品特点

- **简便快捷**：直接裂解，无需孵育时间，1 h 内即可获得超纯的基因组 DNA
- **高通量**：可整合移液法自动化仪器和磁棒法自动化仪器进行高通量提取实验
- **安全无毒**：无需酚/氯仿等有机试剂
- **纯度高**：获得的 DNA 纯度高，可直接用于芯片检测、高通量测序等实验

提取得率

	样本	最适提取量	DNA 得率 (µg)
鼠	脑	25 mg	20-30 µg
	心脏	25 mg	20-30 µg
	肝脏	25 mg	30-50 µg
	脾脏	25 mg	50-70 µg
	肺	25 mg	50-70 µg
	肾脏	25 mg	30-50 µg
	尾	大鼠 0.3 cm 小鼠 0.6 cm	50-80 µg
其他组织类型	肌肉组织	50 mg	5-10 µg
	鱼	50 mg	5-10 µg
	虾	50 mg	5-10 µg
	贝	30 mg	30-50 µg
微量样本	口腔拭子	1	0.2-1 µg
	干血斑	3片 3×3 mm	0.2-1 µg

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 本产品适用于手工提取或自动化仪器整合。
2. 自备试剂：异丙醇，乙醇。
3. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
4. 若裂解液 GHB 中有沉淀，可在 37℃ 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
5. 如需去除 RNA 残留，需自备 RNase A (100 mg/ml) 溶液 (TIANGEN, RT405-12)。

操作步骤

使用前请先在缓冲液 GDA 和漂洗液 PWD 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶子上的标签。

一、手工操作步骤：

1. 取动物组织 10-50 mg，尽量剪成小块，加入 200 μ l 组织消化液 GHA 和 20 μ l Proteinase K，使用电动匀浆机研磨约 10 s 至组织研磨充分。

- 1) 匀浆后仍有肉眼可见的组织块的样本，建议 65℃ 消化 30 min 至消化完全；
- 2) 对于匀浆充分的样本，可以省去 65℃ 消化的步骤；
- 3) 对于鼠尾样本，建议于 56℃ 消化过夜；

注意：样本消化完成后，如果有组织碎片，建议 12,000 rpm 离心 1 min 去除残留杂质。

注意：如果需要去除 RNA，加入 4 μ l RNase A 室温放置 10 min (TIANGEN, RT405-12, 自备)

2. 加入 300 μ l 裂解液 GHB，振荡混匀。
3. 将离心管置于 75℃，孵育 15 min，期间颠倒混匀 3 回，每回 3-5 次。
4. 室温放置 5 min。
5. 加入 350 μ l 异丙醇，振荡混匀 10 sec。
6. 加入 30 μ l 磁珠悬浮液 G，振荡混匀 1 min，共静置 9 min，每 3 min 振荡混匀 1 min。

注意：为了确保磁珠彻底重悬，请在使用前振荡混匀。

对于口腔拭子和干血斑等基因组 DNA 含量少的样本，建议使用 15 μ l 的磁珠；

对于肌肉组织等基因组 DNA 含量中等的样本，建议使用 20 μ l 的磁珠；

对于鼠的脾脏等基因组 DNA 含量高的样本，建议使用 30 μ l 的磁珠。

-
7. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
 8. 加入 700 μ l 缓冲液 GDA(**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**), 振荡混匀 30 sec。
 9. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
注意: 如果对于 DNA 纯度要求更高, 可以重复步骤 8 和 9 一次。
 10. 加入 700 μ l 漂洗液 PWD(**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**), 振荡混匀 30 sec。
 11. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec, 磁珠完全吸附后, 小心吸去液体。
 12. 重复步骤 10 和 11 一次。
 13. 将离心管于磁力架上, 室温晾干 10-15 min。
注意: 乙醇残留会抑制后续的酶反应, 所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间, 以免难以洗脱 DNA。
 14. 将离心管从磁力架上取下, 加入 100-200 μ l 洗脱缓冲液 TB, 振荡混匀, 置于 56 $^{\circ}$ C, 孵育 10 min, 期间颠倒混匀 3 回, 每回 3-5 次。
 15. 将离心管放置于磁力架上静置 2 min, 磁珠完全吸附后, 小心将 DNA 溶液转移至一个新离心管中, 并于适当条件保存。

二、移液法自动化仪器提取步骤

准备工作及注意事项：

1. 本产品可整合 Hamilton Microlab STAR、Beckman Coulter Biomek[®] FX 和 Capitalbio LabKeeper 等移液法自动化仪器进行高通量基因组提取工作。
2. 组织样本的处理：同手工法样本处理，消化完成后转入 96 孔深孔板内。
3. 磁珠稀释液的配制：按照 30 μ l 磁珠悬浮液 G 加入 70 μ l 异丙醇的比例混合，混合后每个样本用量为 100 μ l。
4. 对于 Hamilton Microlab STAR 类的仪器，有放置 2 ml 离心管的板位，可以不使用异丙醇来稀释磁珠，异丙醇的加入体积仍为 350 μ l。每个离心管可以放入 1 ml 左右的磁珠，吸取磁珠前吹打混匀 5 次，直接进行 30 μ l 磁珠的分液操作，分液完成后将磁珠管盖盖好保存。
5. 对于动物脾脏、肝脏和肾脏等 DNA 含量丰富的样本，建议裂解后加入异丙醇吹打混匀 5 次以后，再加入磁珠进行混匀，避免磁珠聚集后不易进行充分的漂洗。
6. 考虑仪器设定温度和 96 孔板内的实际温度有一定的偏差，在裂解和洗脱时建议仪器设定温度比实际使用温度高出 10 $^{\circ}$ C。

提取步骤：

1. 在 96 深孔板(自备)中加入 200 μ l 处理好的组织样本。
2. 每孔加入 300 μ l 裂解液 GHB，吹吸 6 次。
3. 将深孔板置于 75 $^{\circ}$ C，孵育 15 min，振荡混匀。
4. 将加热模块温度调至 25 $^{\circ}$ C，继续振荡 5 min。
5. 每孔加入 270 μ l 的异丙醇，吹吸 6 次，然后振荡混匀 5 min。
6. 每孔加入 100 μ l 磁珠稀释液，吹吸 6 次，然后振荡混匀 10 min。
7. 将深孔板放置于磁力架上静置 2 min，磁珠完全吸附后，吸去液体。
8. 将深孔板从磁力架上取下，加入 100 μ l 缓冲液 GDA，振荡混匀 2 min。然后再加入 600 μ l 缓冲液 GDA，吹吸 6 次，然后振荡混匀 2 min。
9. 将深孔板放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，吸去液体。

注意：如果对于 DNA 纯度要求更高，可以重复步骤 8 和 9 一次。

-
10. 将深孔板从磁力架上取下，加入 100 μl 漂洗液 PWD，振荡混匀 1 min。然后加入 600 μl 漂洗液 PWD，吹吸 6 次，然后振荡混匀 2 min。
 11. 将深孔板放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，吸去液体。
 12. 重复步骤 10 和 11 一次。
 13. 将深孔板置于磁力架上，37°C 晾干 5 min。
 14. 将深孔板从磁力架上取下，加入 100-200 μl 洗脱缓冲液 TB，置于 65°C，振荡混匀 10 min。
 15. 将深孔板放置于磁力架上静置 2 min，磁珠完全吸附后，小心将 DNA 溶液转移至收集板中，并于适当条件保存。

三、磁棒法自动化仪器提取步骤

准备工作及注意事项：

1. 本产品可在 Thermo KingFisher Flex 等自动化仪器上整合成功。
2. 组织样本的处理：同手工法样本处理，消化完成后转入 96 孔深孔板内。
3. 将 300 μl 缓冲液 GHB、700 μl 缓冲液 GDA、700 μl 漂洗液 PWD 和 100-200 μl 洗脱缓冲液 TB 分别加到 96 孔板相应的位置上，将 30 μl 磁珠 G 加入到 700 μl 缓冲液 GDA 中。
4. 使用磁棒法仪器也可以按照移液法仪器的操作步骤，需要裂解步骤完成后，设置暂停步骤再加入异丙醇。

提取步骤：

1. 将处理好的组织样本加入到含有裂解液 GHB 的 96 孔样品板里。
2. 将 96 孔板置于自动化提取仪中，75 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，期间中速和快速间隔拍打混匀。
3. 仪器暂停后，每孔加入 350 μl 异丙醇，快速拍打混匀 5 min。
4. 使用磁力套深入到含有磁珠的缓冲液 GDA 的孔中，快速拍打混匀 1 min，吹散磁珠。
5. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
6. 将磁珠转移到含有组织消化液和裂解液 GHB 的孔中，释放磁珠，中速和快速间隔拍打混匀 10 min。
7. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
8. 将磁珠转移到含有第一遍缓冲液 GDA 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。
9. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
10. 将磁珠转移到含有第二遍缓冲液 GDA 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。
11. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
12. 将磁珠转移到含有第一遍漂洗液 PWD 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。
13. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
14. 将磁珠转移到含有第二遍漂洗液 PWD 的孔中，释放磁珠，快速拍打混匀 3 min。

-
15. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 20 sec。
 16. 磁力棒吸附磁珠后悬空晾干 5 min。
 17. 将磁珠转移到含有洗脱缓冲液 TB 的孔中，75°C 孵育，快速拍打混匀 10 min。
 18. 磁力棒深入到磁力套中，吸附磁珠 3 次，每次 30 sec。
 19. 将吸附的废弃磁珠转移到含有漂洗液 PWD 的孔中，拍打混匀 1 min。
 20. 程序结束后，小心将 DNA 溶液转移至收集板，并于适当条件保存。

DNA 浓度及纯度检测

得到的基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。

DNA 应在 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA、40 μg/ml 单链 DNA。

OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。