

已降解基因组 DNA 小量提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒采用独特的组织和细胞裂解液，配合蛋白酶 K 裂解细胞释放基因组 DNA，Buffer GB 调整 DNA 结合条件后，释放的基因组 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上。

本试剂盒能有效回收≥50 bp 的 DNA 片段，特别适合从 DNA 已经严重降解的动物组织中提取 DNA，比如动物源性饲料或者固体食品、因保存不当 DNA 已经严重降解的组织，也适合从 Trizol 相间沉淀中提取 DNA。

本试剂盒使用 DNA 吸附柱-CA 回收 DNA，最大吸附量为 10 μg DNA，最小洗脱体积为 15 μl。

相关产品：痕量 DNA 提取试剂盒(DK803)

使用 DK803 处理 DNA 有明显降解的组织(乙醇或者福尔马林等固定液浸泡的组织 and 石蜡包埋的组织)可获得更高的产量，石蜡包埋组织无需脱蜡。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK614-01 (50 次)	原理与用途
Proteinase K [*]	1 ml	降解蛋白
Buffer TG-A	15 ml	分散组织
Buffer GL	15 ml	释放 DNA
Buffer GB	30 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	30 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB2 [§]	16 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-CA	50 个	吸附 DNA
收集管	50 个×2	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	接收洗脱的 DNA
TE [※]	15 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	

^{*} Proteinase K：20 mg/ml，室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物，不影响使用效果，使用前混合均匀。

[§] Buffer WB2：第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇，混合均匀。

[※] TE：10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% NaN₃, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

三、注意事项

1. Buffer TG-A、Buffer GL、Buffer GB 和 Buffer WAG 含刺激性化合物，避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处，必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖，以免影响下次使用效果，尤其是 Buffer GB、Buffer WAG 和添加乙醇后的 Buffer WB2。

四、实验准备

1. 56°C 和 70°C 水浴或温箱；56°C-70°C 预热 TE 或去离子水 (pH≥7)。
2. Buffer GL 可能会析出乳白色凝集物，需 56°C 水浴加热溶解，或使用前摇晃均匀。
3. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇，混合均匀。
4. 从 Trizol 相间沉淀中提取 DNA 需准备用于捣碎沉淀物的研磨棒或一次性筷子。

五、操作步骤

所有离心条件为室温，12,000-16,000×g；如离心机只能设定转速，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

DNA 吸附柱-CA 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中，不影响使用效果。

(一) 从因保存不当 DNA 已经严重降解的组织中提取基因组 DNA

4℃或者室温长期放置或者反复冻融多次的组织中大部分基因组 DNA 已降解

1. 称取 ≤ 25 mg 组织放入干净的 1.5 ml 离心管中。
2. 加入 $20 \mu\text{l}$ Proteinase K，加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer TG-A，Vortex 10 秒或剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 56℃水浴或温箱，间断混合，直至组织块完全被消化(约 1 小时)，毛发和骨组织等不能被完全消化，不影响后续实验；批量处理样品建议温育过夜，水浴期间无需混合。
3. 加入 $200 \mu\text{l}$ Buffer GL，Vortex 震荡 10 秒或者剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 70℃水浴或温箱 10 min。
4. 加入 $350 \mu\text{l}$ Buffer GB，温和翻转离心管 10 次混合均匀将溶液转入 DNA 吸附柱-CA(置于收集管中)。
5. 离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-CA 放入另外一个干净的收集管中。
6. 加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer WAG，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。
7. 加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer WB2，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。
8. 加入 $100 \mu\text{l}$ Buffer WB2，离心 2 min。
9. 将 DNA 吸附柱-CA 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 $\geq 15 \mu\text{l}$ TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，离心 1 min。
 - ▲ 55-60℃预热 TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，可以提高洗脱效率。
 - ▲ 如使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。

(二) 从动物源性饲料、固体食品中提取基因组 DNA

动物源性饲料、食品经消毒和烘干等加工工艺，大部分基因组 DNA 已降解

1. 称取 ≤ 50 mg 组织放入干净的 1.5 ml 离心管中。
2. 加入 $20 \mu\text{l}$ Proteinase K，加入 $250 \mu\text{l}$ Buffer TG-A，Vortex 10 秒或剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 56℃水浴或温箱至少 20 min，温育期间至少剧烈摇晃混合一次，大批量处理样品建议温育过夜。毛发、骨组织和额外添加的植物源性成分不能被完全消化，富含植物淀粉或者动物糖原的样品溶液会变得非常粘稠，不影响后续实验。
3. 加入 $250 \mu\text{l}$ Buffer GL，Vortex 震荡 10 秒或剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 70℃水浴或温箱 10 min。
4. 加入 $450 \mu\text{l}$ Buffer GB，剧烈摇晃 20 次混合均匀。
5. 离心 1 min。吸取 $\leq 750 \mu\text{l}$ 离心上清转入 DNA 吸附柱-CA(置于收集管中)。
6. 离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-CA 放入另外一个干净的收集管中。
7. 加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer WAG，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。
8. 加入 $500 \mu\text{l}$ Buffer WB2，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。
9. 加入 $100 \mu\text{l}$ Buffer WB2，离心 2 min。
10. 将 DNA 吸附柱-CA 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 $\geq 15 \mu\text{l}$ TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，离心 1 min。
 - ▲ 55-60℃预热 TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，可以提高洗脱效率。
 - ▲ 如使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。

(三) 从 Trizol 相间沉淀中提取 DNA

Trizol 为强酸性溶液导致 DNA 水解、断裂(并非降解), 产生涂抹带, DNA 的完整性与样品在 Trizol 中浸泡的时间有关

1. 样品预处理

- 1.1 按常规 Trizol 分离 RNA 的方法获得相间沉淀和下相;
- 1.2 在下相和相间沉淀中加等体积异丙醇, 约 600 μ l, 离心 1min, 倒弃上清;
- 1.3 加 600ul 无水乙醇, 剧烈摇晃, 离心 1min, 倒弃上清;
- 1.4 简短离心, 仔细吸除上清。

2. 捣碎沉淀物: 使用研磨棒或合适大小的一次性筷子反复戳碎沉淀物。

▲ 沉淀物非常致密, 必须用机械力捣碎, 不然步骤 3 无法充分分散沉淀物, 导致产量下降。

3. 加入 **20 μ l Proteinase K**和 **200 μ l Buffer TG-A**, 剧烈摇晃 20 次混合, 置于 56 $^{\circ}$ C 水浴或温箱 1 小时, 间断混合。

4. 加入 **200 μ l Buffer GL**, 剧烈摇晃 20 次, 置于 70 $^{\circ}$ C 水浴或温箱 10 min。

5. 实验准备: 在干净的离心管中加入 **350 μ l Buffer GB**; 将 DNA 吸附柱-RD 置于收集管中, 并做好标记。

6. 样品离心 1 min, 仔细吸取上清, 转入步骤 5 准备的 Buffer GB 中, 缓慢吹打 3 次, 转入 DNA 吸附柱-CA。

7. 离心 1 min, 弃收集管, 将 DNA 吸附柱-CA 放入另外一个干净的收集管中。

8. 加入 **500 μ l Buffer WAG**, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。

9. 加入 **500 μ l Buffer WB2**, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-CA 放回收集管中。

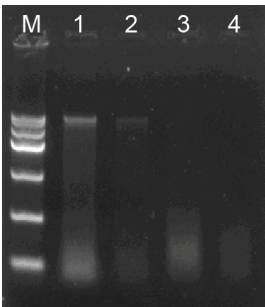
10. 加入 **100 μ l Buffer WB2**, 离心 2 min。

11. 将 DNA 吸附柱-CA 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 \geq 15 μ l TE 或去离子水(pH \geq 7.0), 离心 1 min。

▲ 55-60 $^{\circ}$ C 预热 TE 或去离子水(pH \geq 7.0), 可以提高洗脱效率。

▲ 如使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 \geq 7.0。

六、实验示例

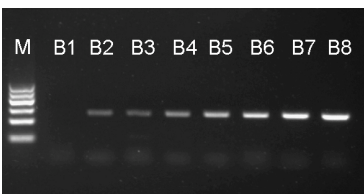


←图 1: 使用 DK614 从 50mg 动物源性饲料中提取 DNA, 50 μ l 洗脱 2 次, 洗脱总体积 100 μ l 体积, 取 1 μ l 电泳; 0.8%琼脂糖凝胶;

M: DL15,000

1 使用 DK614, 2 使用同行公司产品, 从一份饲料中提取 DNA;

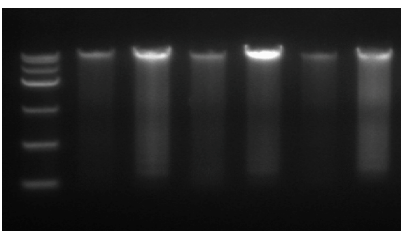
3 使用 DK614, 4 使用同行公司产品, 从一份饲料中提取 DNA。



←图 2: 以图 1 中 3# DNA 按浓度梯度作为模板 PCR 检测牛源基因, 25 μ l 体系, 35cycles, 取 2 μ l 电泳; 2%琼脂糖凝胶;

M: Marker I

B8 模板为 1 μ l 3#DNA, B8-B2 按 2 倍梯度稀释, B1 为空白对照



←图 3: 样品为 Trizol 提取 RNA 后剩余的相间沉淀与下相, 室温放置 1-3 个月不等