

# 水产动物组织 gDNA 提取试剂盒

( 磁珠法 )

产品编号	规格
CZ315-T	10 次
CZ315-50	50 次
CZ315-50	100 次

## 产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的纳米磁珠和独特的缓冲液系统,提取多种动物(软体动物、水产动物、哺乳动物、节肢类动物、昆虫等)组织中的基因组 DNA。离心柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料,能够高效、专一吸附 DNA,可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组 DNA 片段大,纯度高,质量稳定可靠。

## 一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	保存	CZ315-T	CZ315-50	CZ315-100
纯化次数		10 次	50 次	100 次
蛋白酶 K	-20℃	20mg/支×1 支	20mg/支×1 支	20mg/支×2 支
样品处理液 (ETB)	室温	2mL/瓶×1 瓶	10mL/瓶×1 瓶	20mL/瓶×1 瓶
裂解液(Buffer ATL)	室温	5mL/瓶×1 瓶	30 mL/瓶×1 瓶	60mL/瓶×1 瓶
洗液 1 (wash1)	室温	6mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×1 瓶	36 mL /瓶×1 瓶
洗液 2 (wash2)	室温	2mL /瓶×1 瓶	10mL /瓶×1 瓶	18mL /瓶×1 瓶
Elution Buffer	室温	1mL /支×1 支	10 mL /瓶×1 瓶	10 mL /瓶×1 瓶
磁珠	室温	220μl 支×1 支	1.1ml 支×1 支	1.1ml 支×2 支
说明书	室温	1 份	1 份	1 份

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时,若裂解液(Buffer ATL)产生沉淀,请先将裂解液(Buffer ATL)室温(20-30℃)条件下放置一段时间,必要时可放 37℃水浴中温浴 10 min,以溶解沉淀。蛋白酶 K 收到后请立即使用或放于-20℃下保存,室温放置半个月有效。

## 二、实验前准备

- 56℃水浴锅或恒温金属浴、涡旋振荡器、掌心离心机、核酸提取仪、磁力套、96 孔板
- 需要试剂无水乙醇、异丙醇
- 蛋白酶 K 溶液需保存-20℃,从冰箱中取出解冻,反复冻融降低蛋白酶 K 活性。
- 使用前,请按下表准确加入 98-100%的乙醇。

	10T	50T	100T
洗液 1 (wash1)	6ml	18ml	36ml
乙醇	4ml	12ml	24ml

	10T	50T	100T
洗液 2 (wash2)	2ml	10ml	18ml
乙醇	8ml	40ml	42ml

### 三、操作步骤

#### 样品处理

使用前请先在洗液1 (wash1) 和洗液2 (wash2) 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取组织样品10~20mg，用剪刀剪切成尽量小的碎片，并转移至1.5mL的离心管中。加入200μl 样品处理液 (Buffer ETB) 和20μl 蛋白酶 K至样品中。涡旋混匀，56℃水浴3小时或过夜消化样品。水浴期间需偶尔涡旋混匀，或放置于振荡水浴锅中。

(过多的样品会降低产量和纯度。脾脏、肝脏、肾脏等组织不超过 **10mg**。小鼠尾巴最大用量为 **1.2cm**，大鼠尾巴最大量为 **0.6cm**。若消化后还有组织块残留，**10000rpm** 离心 **1min**。转移上清 **200μL** 至新的离心管中，按第2步操作。注意：不同组织裂解时间不同，通常需 **1-3 h** 即可完成 (鼠尾需要消化过夜)。不会影响 后续操作。每小时颠倒混合样品 **2-3** 次，用水浴振荡器也可。)

2. (可选) 加入10μl RNase (10mg/ml ; 未提供，需要另购) 至消化液中，颠倒混匀，室温或37℃放置 15~60 分钟。

**RNA** 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 **RNA**，需较长的消化时间。

3. (可选)12,000 × g 离心3 分钟，转移上清液至新的1.5ml 离心管中。

若消化液比较浑浊或存在明显的颗粒，不要省略此步。

#### 提取步骤

4. 将试剂按照下表分装到96孔板中，需要自备80%的无水乙醇，请提前做好。

注意：(若为预封装试剂板，则已经将试剂分装好到 **96** 孔板，实验时，需要瞬离 **30sec**，将封口膜上的液体甩下来，再从 **96** 孔板的一侧撕开封口膜)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	裂解液	洗液1/ 磁珠	洗液2	80%乙醇	80%乙醇	Elution buffer	裂解液	洗液1/ 磁珠	洗液2	80%乙醇	80%乙醇	Elution buffer
A	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
B	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
C	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
D	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
E	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
F	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
G	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100
H	350	500/20	500	500	500	100	350	500/20	500	500	500	100

5. 将处理好的样品全部转移到孔1、7中，打开核酸提取仪的仓门，将准备好的样品板 (注：已经加入试剂和样品的**96**孔板) 放入提取内的卡槽中，插好搅拌套，关闭仓门。

6. 按照如下表，编辑、运行提取程序

序号	步骤名称	孔位	等待时间 (min)	混合时间 (min)	吸磁次数 (times)	混合 速度	溶积 ( $\mu$ l)	加热孔位	温度 ( $^{\circ}$ C)
1	Lysis	1	0.0	5	0	变速	550	1	70
2	Trans	2	99	0.0	2	超速	500	关闭	0
3	Bind	1	0.0	5	2	变速	850	关闭	0
4	W1	2	0.0	1	1	超快	500	关闭	0
5	W2	3	0.0	1	1	超快	500	关闭	0
6	80%Eth	4	0.0	1	1	超快	500	关闭	0
7	80%Eth	5	0.0	1	1	超快	500	关闭	0
8	elute	6	2	5	3	超快	100	6	65
9	drop	7	0.0	1	0	超快	620	关闭	0

7. 程序运行10 min左右，等待1min，此时在孔1、7加入 300  $\mu$ l 异丙醇，将样品板放回提取仪，

8. 程序运行完毕，转移孔6、12的DNA至新的无RNase、DNase离心管中，并保存-20 $^{\circ}$ C或进入下一步实验。

## 常见问题

1.磁珠粘附管壁	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 样品浓度过高或者样品富含的核酸浓度高，适当减少样品的量；</li><li>2. 晾干磁珠的时间长，磁珠过于干燥</li><li>3. 磁吸时间过长</li></ol>
2.DNA 产量低	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 样品与 Buffer ATL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer ATL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer ATL 充分混匀。样品消化不充分：延长消化时间让样品充分消化，用玻璃匀浆器对样品进行匀浆。</li><li>2. 样品中 DNA 含量低，用富含核酸的肝脏/脾脏来提取。</li><li>3. 洗液 1、2 没有加入乙醇稀释。</li><li>4. 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。</li><li>5. 洗脱不充分：洗脱液需加到磁珠上，增加洗脱体积或次数。</li></ol>
3.DNA 纯度不达标	样品与 Buffer ATL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer ATL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer ATL 充分混匀。
4.RNA 污染	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 样品富含 RNA：肝脏、肾脏，培养细胞富含 RNA，延长 RNase A 消化时间至 60 分钟。</li><li>2. 样品用量太多：减少样品用量。</li><li>3. 复杂样品：对于一些富含代谢物质的组织，样品经 Buffer ATL/Proteinase K 消化后，用等倍体积的酚氯仿抽提后，再继续操作</li></ol>
5.样品酶解不彻底	用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。 延长蛋白酶 K 消化时间或过夜消化。