

产品组成

A&DNext动物组织DNA提取试剂盒 Cat. No.	5次样品 A-3101005	50次产品 A-3101050	250次产品 A-3101250
核酸纯化柱	5个	50个	250个
2 ml离心管	5个	50个	250个
蛋白酶K贮存液	120 µl	1.2 ml	1.2 ml×5
Buffer AT	1.5 ml	15 ml	75 ml
Buffer SL	1.2 ml	12 ml	60 ml
Buffer WA	1.9 ml	12 ml	57 ml
Buffer WB	1.5 ml	9.5 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml	60 ml
说明书	1份	1份	1份

A&DNext全血/培养细胞DNA提取试剂盒 Cat. No.	5次样品 A-3002005	50次产品 A-3002050	250次产品 A-3002250
核酸纯化柱	5个	50个	250个
2 ml离心管	5个	50个	250个
蛋白酶K贮存液	120 µl	1.2 ml	1.2 ml×5
Buffer SL	1.2 ml	12 ml	60 ml
Buffer WA	1.9 ml	12 ml	57 ml
Buffer WB	1.5 ml	9.5 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml	60 ml
说明书	1份	1份	1份

产品储存与有效期

1. 蛋白酶 K 贮存液请于 -20℃ 贮存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8℃，可延长产品有效期至两年以上。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管和移液器吸头
3. 一次性乳胶手套等防护用品和纸巾
4. 台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器、水浴锅或干式恒温器
6. 可能需要 PBS 溶液(A&D Cat. No.: A-9004500)
7. 可能需要 RNase A 贮存液(A&D Cat. No.: A-8001001)

技术支持

艾德科技（北京）有限公司研发部：e-mail: tech@aderr.com 电话：010-57225208。

质量保证

艾德科技（北京）有限公司保证所提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求。根据我们以往的经验，用户使用的样本差异是导致结果差异的最主要原因，如果需要从一些罕见的样本中分离纯化DNA，请务必与我们的技术支持沟通后再进行实验操作。

注意事项

Buffer AT、Buffer SL和Buffer WA含刺激性化合物，操作时请戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗咨询。

产品介绍

本产品适合从新鲜的或者是冷冻贮藏的人或动物组织、抗凝全血、细胞、细菌等样本中分离纯化总 DNA（包括基因组 DNA、线粒体 DNA 及可能存在的病毒 DNA）。动物组织或全血样本经蛋白酶 K 消化后，添加乙醇促使 DNA 吸附到纯化柱上，降解的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，DNA 经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

产品适用的样本范围

本产品适合从主要成分是蛋白质的样本中分离纯化 DNA，比如人或动物的组织块、全血、培养细胞等。某些样本虽然也可以用本试剂盒分离纯化 DNA，但样本中的某些组分可能无法被蛋白酶 K 消化，需要做适当的前处理，归类如下：

1. 样本中的细菌DNA

组织或全血中的革兰氏阴性菌或无细胞壁结构的微生物，可被 Buffer AT 溶解。全血中革兰氏阴性细菌 DNA 的分离纯化参考第 11 页 1b 内容“从革兰氏阴性细菌中分离纯化总 DNA”；全血中革兰氏阳性细菌 DNA 的分离纯化推荐使用 A&D 的 A&DNext 全血细菌 DNA 试剂盒（Cat. No.: A-3004050）。

2. 组织中的病毒DNA

本试剂盒能同步分离纯化组织中的病毒 DNA，如果需要更高的病毒 DNA 回收效率并去除宿主基因组 DNA 的污染，我们推荐使用 A&D 的 A&DNext 病毒核酸纯化试剂盒（Cat. No.: A-4002050）从组织研磨上清、血清或者血浆中分离纯化病毒 DNA。

3. 血清、脑脊液、尿液等体液样本中的细胞或者病毒DNA

本试剂盒能回收体液中的细胞或者病毒 DNA，但由于此类体液样本中的 DNA 含量极低，为了保证微量 DNA 的回收效率，我们推荐在操作步骤中添加 A&D Carrier RNA（Cat. No.: A-4003101），或者直接选用 A&D 的 A&DNext 病毒核酸纯化试剂盒（Cat. No.: A-4002050）从体液样本中分离纯化细胞或者病毒 DNA。

4. 石蜡组织样本

大部分石蜡组织切片样本中的 DNA 降解严重，因此我们推荐使用 A&D 的 A&DNext 石蜡组织 DNA 纯化试剂盒（Cat. No.: A-4400050），可以更高效地从石蜡切片中分离纯化 DNA。

操作步骤分析与说明

1. 起始样本

样本	推荐用量
组织	10-25 mg
抗凝全血、唾液、骨髓	200 μ l
骆驼、羊驼、禽类、两栖类、鱼类等红细胞有核生物的全血	5-10 μ l，并用 PBS 溶液稀释到 200 μ l。
培养细胞	200 μ l，5-10 \times 10 ⁶ 的细胞的 PBS 细胞悬液

2. 样本溶解

本产品用蛋白酶 K 消化蛋白，不同样本的消化时间有所差异，比如抗凝全血的消化时间大约是 10 分钟，鼠尾等富含结缔组织的样本可能需要几个小时，或者过夜消化。

3. 柱纯化技术

1) DNA 结合

在含有 DNA 的溶液中补加乙醇后加入纯化柱中短时离心数秒，即可使 DNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，PCR 抑制物或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。

2) 洗涤

纯化柱上通常会残留少量蛋白（如果是血液样本则残留的主要是血色素），Buffer WA 能有效地洗去这些残留的蛋白。

Buffer WB 会洗去残留在膜上的 Buffer WA，确保纯净的 DNA 吸附在纯化柱上。

DNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可，因此对离心速度和离心时间并无严格的要求，可以选用离心机中的“short run”模式运行以节约操作时间。

3) 离心甩干

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟（如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，我们建议至少使用 12000-13000 rpm 离心 2 分钟。）的作用：

- A. 使 Buffer WB 被充分地离心除去。
- B. 在丢弃 Buffer WB 滤液的过程中, 如果有滤液不慎沾染到纯化柱底部, 也可被离心除去。

4) 洗脱 DNA

A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 Buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) 洗脱 DNA, 以便于 DNA 的长期稳定储存; 也可以用去离子水洗脱 DNA, 但是应确保去离子水的 pH 大于 7, 否则将影响 DNA 的洗脱效率。

B. 预热的 Buffer TE 或者去离子水能提高 DNA 的洗脱效率。

C. 将 Buffer TE 或者去离子水加入纯化柱后延长静置的时间(延长至 3-5 分钟)能提高 DNA 的洗脱效率。

D. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 Buffer TE 洗脱 DNA, 无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇, 过度干燥的纯化柱会不利于 DNA 的洗脱。

E. 洗脱的基因组 DNA 片段在 200bp-50kb 之间, 主要的 DNA 片段集中在 30kb 左右。

F. 出于产品使用安全的考虑, 如果离心机没有防泄漏的盖子, 我们建议在洗脱 DNA 的时候将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟, 以避免 1.5 ml 离心管管盖脱落。

4. DNA 的回收效率与纯度

用试剂盒从代表性动物组织/血液中提取 DNA 的参考产量

样品名称	起始量	DNA 产量 (μg)
哺乳动物血液	100 μl	3-6
鸟类血液	10 μl	9-40
淋巴细胞	5×10^6	15-25
HeLa 细胞	2×10^6	15-25
肝脏组织	25 mg	10-30
脑组织	25 mg	15-30
肺组织	25 mg	5-10
心脏	25mg	5-10
肾脏组织	25 mg	15-30
脾脏	10 mg	5-30
小鼠尾	1.2 cm	10-25
大鼠尾	0.6 cm	20-40
猪耳朵	25 mg	10-30
马鬃	10 丝	2-4
鱼鳍	20 mg	10-20
鱼卵 (马鲛鱼)	10 mg	5-10
虾肉	50 mg	4-8

从人或哺乳动物全血中回收的 DNA 量主要取决于血液中白细胞的数量(红细胞无核, 不含 DNA), 通常从 200 μl 正常人全血中能回收到 3-10 μg DNA。但如果已知血液中白细胞的数量高于正常范围, 建议用 200 μl Buffer TE 洗脱 DNA, 以便于充分洗脱 DNA。

DNA 的质量通常用测量 260 nm 处的光吸收值进行估算。为了精确估算, 260 nm 的吸光值应处于 0.1 至 1.0 之间, 因此洗脱的 DNA 如果用于检测 260 nm 的吸光值, 稀释比例不应超过 5 倍。

DNA 的纯度通常用 A_{260}/A_{280} 进行估算。纯净的 DNA 比值应该在 1.7-1.9 之间, 同样为了确保精确估算核酸纯度, 洗脱的 DNA 的稀释比例也不应该超过 5 倍。

5. 提高从全血中回收 DNA 的产量

如果有足够的新鲜抗凝全血(注意: 如果是经过冷冻的全血, 则不能采用以下方案提高 DNA 的产量), 采取以下方案能使每次分离纯化到的 DNA 提高到 15 μg 或者更多。配制红细胞裂解液(NH_4Cl 8.02g, NaHCO_3 0.84g, EDTA 0.37g 溶于 1 升水中); 或者直接购买 A&D 红细胞裂解液 (Cat. No.: A-9000500)

1) 向 15 ml 离心管中加入 8 ml 红细胞裂解液, 再加入 2 ml 抗凝全血, 盖上管盖后颠倒混合均匀, 室温静置 5 分钟。3000 rpm (约 $3400 \times g$) 离心 5 分钟。

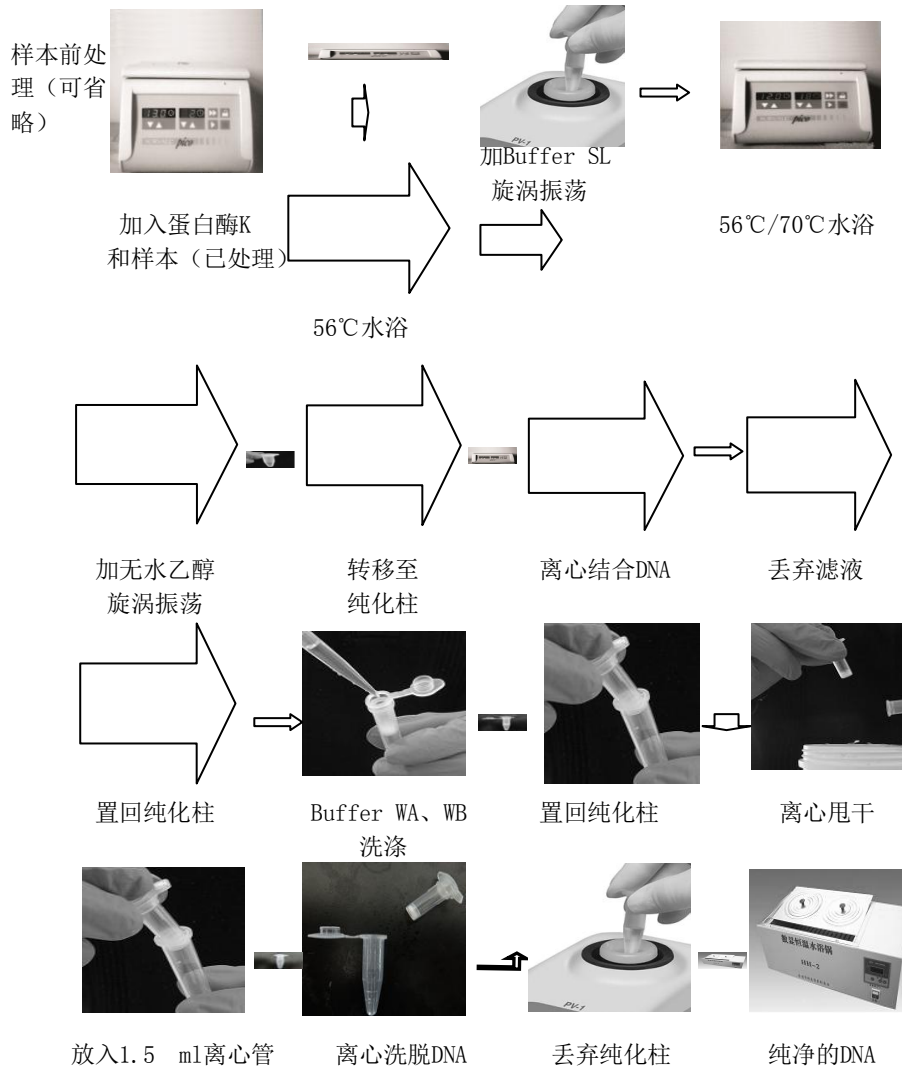
* 如果血液体积小于 2 ml 的, 可按比例减少红细胞裂解液的用量, 其他条件不变。

* 尽量使用在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过一周的抗凝全血, 储存时间超过两周的抗凝全血就可能出现溶血现象, 不适合用红细胞裂解液分离白细胞。

2) 吸弃上清, 保留管底白细胞沉淀。加入 500 μl 红细胞裂解液, 勿弃吸头, 直接用移液器吹打沉淀数次使白细胞悬浮起来。吸取全部悬浮的白细胞转移到一个 1.5 ml 离心管中, 3000 rpm 离心 5 分钟。

3) 弃尽上清, 加入 180 μl PBS 溶液, 旋涡振荡使白细胞完全悬浮起来。加入 20 μl 蛋白酶 K 贮存液, 参考第 6 页“从全血、唾液、培养细胞、精液及革兰氏阳性细菌中分离纯化总 DNA”内容直接进入步骤 2 操作。

操作流程图示



使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将水浴锅温度设置到 56°C 和 70°C (从革兰氏阳性细菌中分离纯化 DNA 还需增加 37°C 水浴设置)，将 Buffer AT 和 Buffer TE 温育至 56°C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。

从全血、唾液、培养细胞、精液及革兰氏阳性细菌中分离纯化总 DNA

无核红细胞抗凝全血、唾液或骨髓样本请按步骤 1a 操作；

有核红细胞抗凝全血样本请按步骤 1b 操作；

培养细胞样本请按步骤 1c 操作；

精液样本请按步骤 1d 操作；

革兰氏阳性细菌样本请按步骤 1e 操作。

1a. 加 20 μl 蛋白酶K贮存液到 1.5 ml 离心管管底，再加入 200 μl 抗凝全血、唾液或骨髓。进入步骤 2 操作。

* 如果抗凝全血的体积小于 200 μl，请补加 PBS 溶液使血液终体积调整到 200 μl。

1b. 加20 μl蛋白酶K贮存液到1.5 ml或2 ml离心管中，加入190 μl PBS溶液，再加入5-10 μl有核红细胞抗凝全血。进入步骤2操作。

1c. 在1.5 ml离心管中收集 $\leq 5 \times 10^6$ 培养细胞，加入180 μl PBS溶液，旋涡振荡充分悬浮培养细胞。加入20 μl蛋白酶K贮存液，进入步骤2操作。

*细胞收集方法:

- 悬浮培养的细胞：300×g离心5分钟收集约 5×10^6 培养细胞，弃上清液。
- 贴壁培养的细胞：弃培养上清，用胰酶消化并悬浮细胞，300×g离心5分钟收集约 5×10^6 培养细胞，弃胰酶上清液。
- 细胞培养板中单孔培养的细胞：弃培养上清，用180 μl PBS悬浮细胞后，将细胞悬浮液转移到1.5 ml离心管中，直接进入步骤2操作。

1d. 加20 μl蛋白酶K贮存液到1.5 ml离心管管底，再加入200 μl液化的精液和15 μl Buffer SP。进入步骤2操作。

* Buffer SP请单独订购(A&D Cat. No.: A-9007001)

*如果从少于200 μl的精液中纯化DNA，补加PBS溶液使样本达到200 μl。

1e. 用1.5 ml离心管收集1-3 ml细菌培养物，加入100 μl Buffer TE，旋涡震荡充分悬浮细菌。加入100 μl溶菌酶溶液，旋涡振荡约15秒混匀，37 °C水浴30分钟。加入20 μl蛋白酶K贮存液，进入步骤2操作。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如MRS培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入1 ml蒸馏水，旋涡震荡悬浮细菌后12000 rpm离心30秒，弃蒸馏水上清，再加入200 μl Buffer TE，旋涡震荡充分悬浮细菌。

* 溶菌酶溶液配制方法：按每1 ml去离子纯水加入100 mg溶菌酶的比例配制成100 mg/ml的溶菌酶溶液。

* 溶菌酶溶液冻融后会严重降低溶菌效率，请尽量使用新鲜配制的或冻融不超过一次的溶菌酶溶液。

2. 加入200 μl Buffer SL，旋涡振荡约15秒混匀。将离心管置于56 °C水浴10分钟。低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底。

* 如果从非常新鲜的样本中提取DNA，可能会将部分RNA一起分离纯化出来，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验。如果要彻底除去RNA，可在本步骤中补加5μl RNase A储存液（50 mg/ml，请单独订购，A&D Cat. No.: A-8001001）。

3. 加入200 μl无水乙醇，旋涡振荡约15秒混匀。

4. 吸取步骤3中的溶液加入到核酸纯化柱（纯化柱置于2 ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm离心30 秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

5. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入500μl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30 秒。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μl Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，盖上管盖，14000 rpm离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

8. 弃2 ml离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管中，在纯化柱的膜中央加入100~200 µl 56 °C温育的Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA 储存于-20 °C备用。

从动物组织中分离纯化总 DNA

1. 用手术刀切取≤25 mg人或动物组织（脾脏少于10 mg，大鼠尾0.4-0.6 cm一段或小鼠尾0.4-0.6 cm两段），再用刀尖将组织剁成匀浆状，转移组织到一个1.5 ml离心管中。

* 必须将组织颗粒剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。

* 如果所提取的组织中含结缔组织较多，比如皮肤、肌腱、鼠尾等，则应用手术刀刀尖将组织切成尽量小的碎屑，以缩短溶解时间。

2. 加入20 µl蛋白酶K贮存液，再加入180 µl 56 °C预热的Buffer AT，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。

3. 56 °C水浴10-30分钟，期间旋涡振荡数次帮助组织溶解。

* 如果30分钟水浴后发现仍有不可溶解的组织颗粒存在，可延长水浴时间直至组织全部溶解。

* 对于皮肤、肌腱、鼠尾等难以溶解的组织，可56 °C水浴过夜，或者将离心管放入恒温混匀器或摇床中56 °C，900 rpm温育直至组织彻底溶解。

4. 加入200 µl Buffer SL，旋涡振荡约15秒混匀。将离心管置于70 °C水浴10分钟。

* 如果从非常新鲜的组织中提取DNA，可能会同时获得部分RNA，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验，如需去除RNA，请在本步骤中添加5 µl RNase A贮存液（请单独订购，A&D Cat. No.: A-8001001）。

* 如果此步骤结束后发现有不可溶解的颗粒存在（比如昆虫的外骨骼，毛发等），则应于12000 rpm离心1分钟，吸取上清液转移到另一个1.5 ml离心管中，弃沉淀物，保留上清进入步骤5的操作。

5. 加入200 µl无水乙醇，旋涡振荡约15秒混合均匀。

6. 吸取步骤5中的溶液加入到核酸纯化柱（纯化柱置于2 ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

8. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600 µl Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

9. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，14000 rpm 离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

10. 弃2 ml离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入100-200 µl 56 °C温育的Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm离心1分钟，以免1.5 ml离心管管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 °C备用。

从昆虫等节肢动物中分离纯化总 DNA

对于虾、蟹等大型节肢动物，请按步骤1a 操作；对于≤500 mg 以下的节肢动物（如小型昆虫），请按步骤1b 操作。

1a. 用手术刀剥离节肢动物的外骨骼，切取50-80 mg肌肉组织，再用刀尖将组织剁成匀浆状，转移组织到一个1.5 ml离心管中。

1b. 取300~500 mg（包括节肢动物外骨骼）组织放入研钵中，加入液氮研磨成细小颗粒状，

待液氮蒸发后再将组织颗粒快速研磨至粉末状。用液氮预冷的1.5 ml 离心管称取60~120 mg研磨成粉末状的组织。

* 必须将组织研磨成粉末状，方能缩短组织的溶解时间。

* 如果要同步分离动物组织中各种微生物的DNA，昆虫组织必须要经过液氮研磨，使微生物充分破壁。

2. 加入20 μ l蛋白酶K贮存液。加入250 μ l 56 $^{\circ}$ C预热的Buffer AT，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。

3. 56 $^{\circ}$ C水浴30分钟，期间旋涡振荡数次帮助组织溶解。

4. 加入250 μ l Buffer SL，旋涡振荡约15秒混匀。将离心管置于70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。

* 如果从非常新鲜的组织中提取DNA，可能会同时获得部分RNA，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验，如需去除RNA，请在本步骤中添加5 μ l RNase A 贮存液（请单独订购，A&D Cat. No.: A-8001001）。

5. 14000 rpm离心1分钟，吸取400 μ l上清液转移到另一个1.5 ml离心管中，弃管底沉淀，进入步骤6的操作。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

6. 加入200 μ l无水乙醇，旋涡振荡约15秒混匀。

7. 吸取步骤6中的溶液加入到核酸纯化柱（纯化柱置于2 ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

8. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。

9. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

10. 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2ml 离心管中，14000 rpm离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

11. 弃2 ml离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入100-200 μ l 56 $^{\circ}$ C温育的Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm 离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm 离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

12. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

从福尔马林固定组织中分离纯化总 DNA

1. 用手术刀切取 \leq 25 mg福尔马林固定组织，每次加入1 ml PBS溶液，共洗涤两次，吸弃PBS溶液。用刀尖将组织剁成匀浆状，转移组织到一个1.5 ml离心管中。

* 必须将组织颗粒剁成匀浆状，方能缩短组织的溶解时间。

* 勿使用超过25 mg的组织，否则将超出蛋白酶K的消化能力，导致纯化柱堵塞等问题。

* 如果所提取的组织中含结缔组织较多，比如皮肤、肌腱等，则应用手术刀刀尖将组织切成尽量小的碎屑。

2. 加入20 μ l蛋白酶K贮存液。加入180 μ l 56 $^{\circ}$ C预热的Buffer AT，旋涡振荡数秒使组织匀浆分散开来。

3. 56 $^{\circ}$ C水浴10-30分钟，期间旋涡振荡数次帮助组织溶解。

* 如果10分钟水浴后发现仍有不可溶解的组织颗粒存在，可延长水浴时间直至组织全部溶解。

* 对于皮肤，肌腱等难以溶解的组织，可将离心管放入恒温混匀器或摇床中56 $^{\circ}$ C，900 rpm温育直至组织彻底溶解。

4. 加入200 μ l Buffer SL，旋涡振荡约15秒混匀。将离心管置于70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。

5. 加入320 μ l无水乙醇，旋涡振荡约15秒混匀。

6. 吸取步骤5中的溶液加入到核酸纯化柱（纯化柱置于2 ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

7. 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心30秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。

8. 弃2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入600

μl Buffer WB, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

10. 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中加入 100-200 μl 56 °C 温育的 Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟, 以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱, 洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 DNA 储存于 -20 °C 备用。

从革兰氏阴性细菌中分离纯化总 DNA

对于单独培养的革兰氏阴性细菌, 请按步骤 1a 操作; 对于抗凝全血中的革兰氏阴性致病菌 (比如梅毒螺旋体等), 请按步骤 1b 操作。

1a. 1.5 ml 离心管收集 1-3 ml 细菌培养物, 加入 180 μl 56 °C 预热的 Buffer AT, 旋涡振荡使沉淀的菌体充分悬浮分散于 Buffer AT 中。

* 加入 Buffer AT 后应立即悬浮细菌沉淀物, 否则 Buffer AT 溶解了沉淀物的表层细菌后, 极难再次悬浮细菌。充分悬浮的细菌应呈均一的悬浊液, 不应留有可见的小菌块。

1b. 在一个 1.5 ml 离心管中加入 100 μl 抗凝全血, 再加入 100 μl 56 °C 预热的 Buffer AT, 旋涡振荡数秒混合均匀。

2. 加入 20 μl 蛋白酶 K 贮存液, 旋涡振荡数秒混匀。

3. 56 °C 水浴 10 分钟, 期间旋涡振荡数次帮助细菌溶解。

* 细菌溶解后应呈清澈透明的粘液状, 如果溶液仍然呈现混浊状, 延长水浴时间至 30 分钟。

4. 加入 200 μl Buffer SL, 旋涡振荡约 15 秒混匀。将离心管置于 70 °C 水浴 10 分钟。

* 如果从非常新鲜的样本中提取 DNA, 可能会同时获得部分 RNA, 但是 RNA 的存在并不影响 PCR 相关的实验, 如需去除 RNA, 请在本步骤中添加 5 μl RNase A 贮存液 (请单独订购, A&D Cat. No.: A-8001001)。

5. 加入 200 μl 无水乙醇, 旋涡振荡约 15 秒混匀。

6. 吸取步骤 5 中的溶液加入到核酸纯化柱 (纯化柱置于 2 ml 离心管中) 中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 500 μl Buffer WA, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将 2 ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 600 μl Buffer WB, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

10. 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱中央加 100-200 μl 56 °C 温育的 Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子, 请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟, 以免管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱, 洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 DNA 储存于 -20 °C 备用。

常见问题分析

1. 回收不到 DNA 或者 DNA 的回收效率低

可能的原因:

- 1) 样本保存不当, 导致样本中的 DNA 降解。比如在 2-8 °C 冰箱放置超过两个星期的全血样本就开始

出现溶血现象，如果需要继续使用血样，则应转入-20 °C 或 -70 °C 冻存。否则获得的DNA将开始出现凋亡细胞的DNA带型，并且此时全血中的DNA随着时间的延长会持续分解，直至分离不到电泳可见的DNA。对于含水量高的组织样本均应贮存于-20 °C，推荐贮存于-70 °C。

- 2) 使用了过多的起始样本。请根据第3页“起始样本”内容决定起始样本的用量。
- 3) Buffer WA或Buffer WB中未加入无水乙醇。应按比例补加无水乙醇，如果是错误地加入了其他试剂，请向我公司技术部寻求帮助。
- 4) 错误地使用了Buffer WA和Buffer WB的洗涤顺序。确保按正确的顺序洗涤纯化柱。
- 5) DNA的洗脱效率差。参考第3页柱纯化技术中的第4点“洗脱DNA”内容优化DNA的洗脱方案。

2. A₂₆₀/A₂₈₀ 比值过低

- 1) 使用水稀释DNA后测试获得的A₂₆₀/A₂₈₀。用试剂盒提供的Buffer TE或10 mM Tris Cl, pH 7.5稀释DNA并测试A₂₆₀/A₂₈₀。
- 2) 使用了过多的起始样本。请根据第3页“起始样本”内容决定起始样本的用量。

3. A₂₆₀/A₂₈₀ 比值过高

纯化的DNA中RNA含量过高。对于新鲜分离的组织样本，不应省略RNase A处理步骤。

4. DNA后续实验效果不佳

- 1) 盐分残留过多。注意Buffer WA和Buffer WB的洗涤顺序，确保按正确的顺序洗涤纯化柱。
- 2) 乙醇残留过多。注意高速空离步骤不可省略，并且空离后的核酸纯化柱应小心取出，避免倒置，以免使2 ml离心管管底的残留滤液接触到核酸纯化柱。
- 3) 使用了过多的DNA用作PCR模板。通常50 μl PCR反应体系中加入100-500 ng DNA作为模板（单拷贝基因）比较适宜。

5. DNA被剪切成小片段，电泳时出现严重拖尾现象

- 1) 样本被反复冻融多次。尽量避免反复冻融样本，或者冷冻贮存前先将分割成小块后再冻存。
- 2) 样本太陈旧。陈旧的样本仅含断裂的DNA片段。

订购信息

样本类型	可适用的试剂盒	产品目录号
全血、骨髓	A&DNext 全血 DNA 小量试剂盒	A-3001050
	A&DNext 全血 / 培养细胞 DNA 试剂盒	A-3002050
	A&DNext 血凝块 DNA 纯化试剂盒	A-4201050
	A&DNext 全血细菌 DNA 试剂盒	A-3004050
	A&DPure 全血总 RNA 试剂盒	A-5201030
血清、血浆	A&DNext 病毒核酸纯化试剂盒	A-4002050
	A&DNext 血浆游离核酸纯化试剂盒	A-3103050
	A&DPure 病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4001050
	A&DPure 超敏病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4003030
尿液、脑脊液	A&DNext 病毒核酸纯化试剂盒	A-4002050
	A&DPure 病毒 RNA 纯化试剂盒	A-4001050
精液	A&DNext 全血 / 培养细胞 DNA 试剂盒	A-3002050
唾液、漱口水	A&DNext 全血 / 培养细胞 DNA 试剂盒	A-3002050
	A&DNext 病毒核酸纯化试剂盒	A-4002050
口腔拭子	A&DNext 口腔拭子 DNA 试剂盒	A-4300050
白膜层、淋巴细胞	A&DNext 全血 / 培养细胞 DNA 试剂盒	A-3002050
组织	A&DNext 动物组织 DNA 试剂盒	A-3101050
	A&DNext 微量 DNA 提取试剂盒	A-3102050
	A&DPure 动物组织总 RNA 试剂盒	A-5001050
骨头、牙齿	A&DNext 微量 DNA 提取试剂盒	A-3102050

显微切割组织	A&DNext 微量 DNA 提取试剂盒	A-3102050
石蜡包埋组织	A&DNext 石蜡组织 DNA 试剂盒	A-4400050
粪便、胃的内含物	A&DNext 粪便 DNA 纯化试剂盒	A-4101050
寄生虫	A&DNext 动物组织 DNA 试剂盒	A-5001050
	A&DNext 粪便 DNA 纯化试剂盒	A-4101050
培养细胞	A&DNext 全血 / 培养细胞 DNA 试剂盒	A-3002050
	A&DNext 全血 DNA 小量试剂盒	A-3001050
	A&DNext 动物组织 DNA 试剂盒	A-5001050
	A&DPure 培养细胞总 RNA 试剂盒	A-5004050
法医和人身份鉴定样本 (包括血斑、精斑、毛发、 烟蒂等)	A&DNext 微量 DNA 提取试剂盒	A-3102050
	A&DNext 微量 DNA 清洁试剂盒	A-2103050
	A&DNext 口腔拭子 DNA 试剂盒	A-4300050
	A&DNext 动物组织 DNA 试剂盒	A-5001050

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
用户需自备的试剂与物品	1
技术支持	1
质量保证	2
注意事项	2
产品介绍	2
产品适用的样本范围	2
操作步骤分析与说明	3
起始样本	3
样本溶解	3
柱纯化技术	3
DNA的回收效率和纯度	4
提高从全血中回收DNA的产量	4
操作流程图示	5
使用前准备	5
操作步骤	6
从全血、唾液、培养细胞、精液及革兰氏阳性细菌中分离纯化总DNA	6
从动物组织中分离纯化总DNA	8
从昆虫等节肢动物中分离纯化总DNA	9
从福尔马林固定组织中分离纯化总DNA	10
从革兰氏阴性细菌中分离纯化总DNA	11
常见问题分析	12
订购信息	13