

# Technical Manual

## Gene *pure*DNA Extraction Kit

50 samples

|                                                |       |     |
|------------------------------------------------|-------|-----|
| 简介                                             | ..... | P 2 |
| 试剂盒内容                                          | ..... | P 2 |
| 试剂盒以外需要的试剂・仪器                                  | ..... | P 2 |
| 保存方法                                           | ..... | P 2 |
| 注意事项                                           | ..... | P 2 |
| 操作说明                                           |       |     |
| 细胞 ( $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells) | ..... | P 2 |
| 细胞 ( $< 1 \times 10^6$ cells)                  | ..... | P 2 |
| 细胞 ( $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells) | ..... | P 2 |
| 细胞 ( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells) | ..... | P 3 |
| 组织 (25~30 mg)                                  | ..... | P 3 |
| 组织 (1 g)                                       | ..... | P 4 |
| 组织 (0.5~1 cm 尾巴)                               | ..... | P 4 |
| 组织 (10 cm 尾巴)                                  | ..... | P 4 |
| 参考数据                                           | ..... | P 5 |
| 常见问题                                           | ..... | P 5 |

**DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.**

## 简介

基因解析法的 Southern blot 分析、构建 Genome library(基因组文库)、及 PCR 实验时，需要短时间内抽提出高纯度的基因组 DNA。本试剂盒只需 3 个简单步骤：①溶解细胞或动物组织细胞、②除掉 RNA 及蛋白质、③乙醇沉淀法回收 DNA，就能从细胞、动物组织及血液中抽提出高浓度的基因组 DNA。本试剂盒不需要苯酚/氯仿。抽提的 DNA 可以用于限制性内切酶(Restriction enzyme)反应、PCR 反应等。

## 试剂盒内容

|                            |               |
|----------------------------|---------------|
| —Lysis buffer              | 28 ml x 1 瓶   |
| —Proteinase K solution     | 0.6 ml x 1 管  |
| —RNase solution            | 0.12 ml x 1 管 |
| —Precipitation solution I  | 6 ml x 1 瓶    |
| —Precipitation solution II | 6 ml x 1 瓶    |
| —TE Buffer(pH8.0)          | 10ml x 1 瓶    |

## 试剂盒以外需要的试剂・仪器

- 100%乙醇、70%乙醇
- PBS buffer(细胞样品)
- 1.5 ml microtube
- 15 ml, 50 ml 离心管
- 移液器及枪头
- 离心机
- Vortex mixer
- 恒温水槽(Constant temperature tank)
- 高速匀质机(Homogenizer)

## 保存方法

本试剂盒需冷藏（0~5℃）保存

### [注意]

- Lysis buffer:开封后室温保存
- Lysis buffer:在 20℃以下可能会分层或沉淀，如有沉淀请在 40~50℃加热至完全溶解后使用。开封后室温保存，使用前摇匀。

## 注意事项

- Precipitation solution I 偶尔有点混浊，但对抽提 DNA 没有影响。
- Precipitation solution I 和 Precipitation solution II 开封后有时盖子上会析出白色的结晶，但对抽提 DNA 没有影响，请放心使用。
- 由于离心管种类的原因，如果达不到 10,000 xg 以上的离心速度，可以适当延长离心时间，根据离心机的适合速度离心。

## 操作说明（细胞样品）

请注意每个样品最大检测量为  $1 \times 10^7$  cells，如果超过  $1 \times 10^7$  cells，将减少检测次数。请根据样品中细胞数量来选择合适的操作说明。

### 细胞 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells

- Step 1** 将 1.5 ml 细胞悬液加到离心管里，离心(200 xg)约 5 分钟后，去除上清液。用 500  $\mu$ l PBS 或其它合适的缓冲液洗脱细胞后再离心(200 xg)5 分钟，去除上清液。  
先将细胞 pellet 涡旋(vortex)约 5 秒，溶解操作会更简单。

- Step 2** 加入 250  $\mu$ l Lysis buffer 和 10  $\mu$ l Proteinase K solution 吹打均匀，65℃水浴培养约 10 分钟至沉淀完全溶解，溶液变澄清。开始吹打后样品溶液的粘性上升，但继续吹打粘性会减小。请吹打至低粘度的状态(大约 3~5 分钟)。

- Step 3** 室温放置 2 分钟后，加入 2  $\mu$ l RNase solution，马上混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)，室温放置 2 分钟。

- Step 4** 加入 50  $\mu$ l Precipitation solution I 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。  
加入 Precipitation solution I 后溶液有白色絮状沉淀析出。

- Step 5** 加入 50  $\mu$ l Precipitation solution II 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)，室温放置 2 分钟。  
加入 Precipitation solution II 后溶液中白色絮状沉淀增多。

- Step 6** 离心(13,000 xg 以上) 5 分钟，将上清液转移到新的 1.5 ml 管子中。  
请注意不要吸取沉淀物，如果上清液中有沉淀物，继续离心。

- Step 7** 加入和上清液等体积的无水乙醇混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。

- Step 8** 离心(2,500 xg)约 2 分钟，分离后去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时)。去除上清液时请注意不要吸取 DNA pellet。

- Step 9** 将 1 ml 70%乙醇加到 DNA pellet 的管子中混合(用 vortex mixer 或充分摇匀)后，离心(2,500 xg)约 2 分钟，去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时)。去除上清液时请注意不要吸取 DNA pellet。

- Step 10** 用 TE buffer 等溶解 DNA pellet。

### 细胞 $<1 \times 10^6$ cells

请按照「细胞  $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  cells」的操作进行。在 Step 7 的加乙醇前，加 2  $\mu$ l glycogen 水溶液(20 mg/ml)可以提高 DNA pellet 的回收率。

### 细胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells

- Step 1** 将 1.5 ml 细胞悬浮液加到离心管里。离心(200 xg)5 分钟后，去除上清液。用 500  $\mu$ l PBS 或其它合适的缓冲液洗脱细胞后，再离心(200 xg)约 5 分钟，去除上清液。  
先将细胞 pellet 涡旋(vortex)约 5 秒，溶解操作会更简单。

- Step 2** 加入 500  $\mu$ l Lysis buffer 和 10  $\mu$ l Proteinase K solution I，吹打均匀，65℃培养约 10 分钟至细胞沉淀完全溶解，溶液变澄清。开始吹打后样品溶液的粘性上升，但继续吹打粘性会减少。请吹打至低粘度的状态(大约 3~5 分钟)。

- Step 3** 室温放置 2 分钟后，加入 2  $\mu$ l RNase solution，马上混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)，室温放置 2 分钟。

- Step 4** 加入 100  $\mu$ l Precipitation solution I 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。  
加入 Precipitation solution I 后溶液中有白色絮状沉淀析出。

- Step 5** 加入 100  $\mu$ l Precipitation solution II 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀), 室温放置 2 分钟。  
加入 Precipitation solution II 后溶液中白色絮状沉淀增多。
- Step 6** 离心(13,000  $\times$ g 以上)5 分钟, 将上清液转移到新的 1.5 ml 管子中。  
请注意不要吸取沉淀物, 如果上清液中有沉淀物, 继续离心。
- Step 7** 加入和上清液等体积的乙醇, 混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。
- Step 8** 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 分离后去除上清液。  
高速长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时请注意不要吸取 DNA pellet。
- Step 9** 将 1 ml 70% 乙醇加到 DNA pellet 的管子中混合(用 vortex mixer 或充分摇匀)后, 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时请注意不要吸取 DNA pellet。
- Step10** 用 TE buffer 等溶解 DNA pellet。

## 细胞 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells

- Step 1** 将 15 ml 细胞悬液加到离心管里, 离心(200  $\times$ g)5 分钟后, 去除上清液。用 5 ml PBS 或其它合适的缓冲液洗脱细胞后, 再离心(200  $\times$ g)约 5 分钟, 去除上清液。  
先将细胞 pellet 涡旋(vortex)约 5 秒, 溶解操作会更简单。
- Step 2** 加入 5 ml Lysis buffer 和 40  $\mu$ l Proteinase K solution I, 吹打均匀, 65 $^{\circ}$ C 培养约 10 分钟至细胞沉淀完全溶解, 溶液变澄清。开始吹打后样品溶液的粘性上升, 但继续吹打粘性会减小。请吹打至低粘度的状态(大约 3~5 分钟)。
- Step 3** 室温放置 2 分钟后, 加入 20  $\mu$ l RNase solution, 马上混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀), 室温放置 2 分钟。
- Step 4** 加入 1 ml Precipitation solution I 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。  
加入 Precipitation solution I 后溶液会有白色絮状沉淀析出。
- Step 5** 加入 1 ml Precipitation solution II 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀), 室温放置 2 分钟。  
加入 Precipitation solution II 后溶液中白色絮状沉淀增多。
- Step 6** 离心(10,000  $\times$ g 以上)5 分钟, 将上清液转移到新的 15 ml 管子中。  
请注意不要吸取沉淀物, 如果上清液中有沉淀物, 继续离心。
- Step 7** 加入和上清液等体积的乙醇, 混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。
- Step 8** 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时, 请注意不要吸取 DNA pellet。

- Step 9** 将 5 ml 70%乙醇加到 DNA pellet 的管子中, 混合(用 vortex mixer 或充分摇匀)后, 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时, 请注意不要吸取 DNA pellet。

- Step10** 用 TE buffer 等溶解 DNA pellet。

## 操作步骤 (组织样品)

请注意每个样品最大检测量为 30 mg, 如果超过 30 mg, 将减少检测次数, 请根据组织样品量来选择合适的操作说明。

## 动物组织 25~30 mg

- Step 1** 将 25~30 mg 动物组织加到 1.5 ml 离心管中, 加入 400  $\mu$ l Lysis buffer 和 10  $\mu$ l Proteinase K solution。
- Step 2** 在 55 $^{\circ}$ C 水浴至组织完全溶解, 每隔 30 分钟吹打一次(或 vortex)样品溶液。  
完全溶解需要 2~3 个小时左右。溶解时间视组织种类而定, 每隔 30 分钟吹打一次(或 vortex)样品溶液, 可以缩短溶解时间。
- 如使用高速匀质机(Homogenizer), 在 Step1 加入 400  $\mu$ l Lysis buffer 和 10  $\mu$ l Proteinase K solution 后匀浆(Homogenize), 65 $^{\circ}$ C 水浴培养约 10 分钟溶液变澄清即可。
- Step 3** 室温放置 2 分钟, 加入 2  $\mu$ l RNase solution 马上混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀), 室温放置 2 分钟。
- Step 4** 加入 80  $\mu$ l Precipitation solution I 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。  
加入 Precipitation solution I 后, 溶液会有白色絮状沉淀析出。
- Step 5** 加入 80  $\mu$ l Precipitation solution II 后混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀), 室温放置 2 分钟。  
加入 Precipitation solution II 后溶液中白色絮状沉淀增多。
- Step 6** 离心(13,000  $\times$ g 以上)5 分钟, 将上清液转移到新的 1.5 ml 管子中。  
请注意不要吸取沉淀物。如果上清液中有沉淀物, 继续离心。
- Step 7** 加入和上清液等体积的乙醇, 混合约 10 秒(用 vortex mixer 或充分摇匀)。
- Step 8** 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时, 请注意不要吸取 DNA pellet。
- Step 9** 将 1 ml 70% 乙醇加到 DNA pellet 的管子中, 混合(用 vortex mixer 或充分摇匀)后, 离心(2,500  $\times$ g)约 2 分钟, 去除上清液。  
高速、长时间的离心对溶解 DNA pellet 有影响(溶解费时), 去除上清液时, 请注意不要吸取 DNA pellet。
- Step10** 用 TE buffer 等溶解 DNA pellet。

## 动物组织 1 g

**Step 1** 将1g动物组织加到50 ml离心管中，加入15 ml Lysis buffer和250  $\mu$ l Proteinase K solution。

**Step 2** 用高速匀质机(Homogenizer)匀浆(Homogenize)，在65°C水浴培养约10分钟至溶液变澄清。

**Step 3** 在室温中放置2分钟降温后，加入70  $\mu$ l RNase solution，马上混合约10秒(用vortex mixer或充分摇匀)，室温放置2分钟。

**Step 4** 加入3 ml Precipitation solution I后，混合约10秒(用vortex mixer或充分摇匀)。  
*加入 Precipitation solution I 后，溶液会有白色絮状沉淀析出。*

**Step 5** 加入3 ml Precipitation solution II后，混合约10秒(用vortex mixer或充分摇匀)，室温放置2分钟。  
*加入 Precipitation solution II 后，溶液中白色絮状沉淀增多。*

**Step 6** 离心(10,000  $\times$ g 以上)5分钟，将上清液转移到新的50 ml管子中。  
*请注意不要吸取沉淀物，如果上清液中有沉淀物，继续离心。*

**Step 7** 加入和上清液等体积的无水乙醇，混合约10秒(用vortex mixer或充分摇匀)。

**Step 8** 离心(2,500 $\times$ g)约2分钟，分离后去除上清液。  
*高速，长时间的离心对溶解DNA pellet有影响(溶解费时)，去除上清液时，请注意不要吸取DNA pellet。*

**Step 9** 将20 ml 70%乙醇加到DNA pellet的管子中，混合(用vortex mixer或充分摇匀)后，离心(2,500  $\times$ g)约2分钟，去除上清液。  
*高速，长时间的离心对溶解DNA pellet有影响(溶解费时)，去除上清液时，请注意不要吸取DNA pellet。*

**Step10** 用TE buffer等溶解DNA pellet。

## 老鼠尾 10 cm

**Step 1** 将10 cm的老鼠尾加到50 ml离心管中，加入15 ml Lysis buffer和250  $\mu$ l Proteinase K solution。

**Step 2** 在55°C水浴培养至组织完全溶解。每隔30分钟吹打一次(或vortex)样品溶液。  
*一般完全溶解需要约4个小时。用灭菌后的镊子等除掉不能溶解的骨和毛，或离心分离(2500  $\times$  g、2分钟、室温以下)，将上清液转移到新的50ml离心管中。*

然后按照「动物组织 1 g」的Step 3开始进行操作。

## 老鼠尾 0.5~1 cm

**Step 1** 取0.5~1 cm的老鼠尾加到1.5 ml离心管子中，加入400  $\mu$ l Lysis buffer和10  $\mu$ l Proteinase K solution。

**Step 2** 在55°C水浴培养至组织完全溶解。每隔30分钟吹打一次(或vortex)样品溶液。  
*完全溶解需要2~3个小时。用灭菌后的镊子等除掉不能溶解的骨和毛。*

然后按照「动物组织 25~30 mg」的Step 3开始进行操作。

## 参考数据

表. DNA 回收量和纯度

| 样品                                    | 回收量 (μg)   | A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> |
|---------------------------------------|------------|------------------------------------|
| HeLa cell (1 x 10 <sup>7</sup> cells) | 80-120 μg  | 1.7-1.9                            |
| HeLa cell (1 x 10 <sup>8</sup> cells) | 1-1.5 mg   | 1.7-1.9                            |
| HL60 cell (1 x 10 <sup>7</sup> cells) | 40-60 μg   | 1.7-1.9                            |
| HL60 cell (1 x 10 <sup>8</sup> cells) | 500-900 μg | 1.7-1.9                            |
| Mouse liver (25-30 mg)                | 40-100 μg  | 1.7-1.9                            |
| Mouse brain (25-30 mg)                | 20-40 μg   | 1.7-1.9                            |
| Mouse kidney (25-30 mg)               | 50-60 μg   | 1.7-1.9                            |
| Mouse heart (25-30 mg)                | 20-25 μg   | 1.7-1.9                            |
| Mouse tail (0.5-1 cm)                 | 40-60 μg   | 1.7-1.9                            |
| Rat liver (1 g)                       | 2-2.5 mg   | 1.7-1.9                            |
| Rat brain (1 g)                       | 600-800 μg | 1.7-1.9                            |
| Rat kidney (1 g)                      | 1.8-2.3 mg | 1.7-1.9                            |
| Rat heart (0.8-0.9 g)                 | 600-800 μg | 1.7-1.9                            |
| Rat tail (10 cm)                      | 2.5-3.5 mg | 1.7-1.9                            |

## 常见问题

- 1) 不能回收 DNA 或回收率很低。
  - 吹打或 vortex，一定要完全溶解样品。
  - 注意离心后的操作。有的离心管，离心后 DNA pellet 没有完全附着在管壁上。去除上清液时请注意不要吸取 DNA pellet。
- 2) 用 Lysis buffer 很难溶解细胞。
  - 有时细胞 pellet 会聚团（固化），很难溶解。加入 Lysis buffer 前，用 Vortex mixer 搅拌细胞 pellet 可以帮助溶解。
  - 1x10<sup>7</sup> cells ~ 1x10<sup>8</sup> cells 的细胞抽提时，用 4 ml Lysis buffer、20 μl Proteinase K solution、20 μl RNase solution、800 μl Precipitation solution I 和 800 μl Precipitation solution II。采用 15 ml 或 50 ml 的离心管，按管子使用范围内的速度离心。
  - 吹打时可以切掉枪头顶端(2~3 mm)扩大口径后使用，慢慢吹打。
  - 将组织样品加入管子前，先切成小块或加入 Lysis buffer 后用高速匀质机(Homogenizer) 匀浆。
  - 加温溶解时吹打几次样品溶液或 vortex。
- 3) Step 6 的离心分离后沉淀物没有沉淀下来。
  - 充分溶解样品后加入 Precipitation solution I。
  - 将 Precipitation solution I 和 II 加入后、充分混合(用 vortex mixer 或充分摇匀)。
  - 不能达到 13,000 xg 以上的离心速度时，可以延长离心时间至沉淀物沉淀下来。
- 4) 抽提的 DNA 纯度很低。
  - Step 6 时，请注意不要吸取沉淀物。
  - Step 7 时，请用和上清液等体积的乙醇，过量乙醇有时会混入 RNA 片段。加入 RNase solution 后室温放置 2 分钟。
- 5) 抽提的 DNA 被分解 / 切断了。
  - 使用新鲜的样品。
  - 操作中动作请尽量轻柔。

<开发商>

**Dojindo Molecular Technologies, Inc.**  
 30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, MD 20850  
 Phone : +1-301-987-2667  
 Fax : +1-301-987-2687  
 URL : <http://www.dojindo.com/>

<生产商>

**株式会社同仁化学研究所**  
 Tel: +81-96-286-1515 Fax: +81-96-286-1525

<销售商>

**东仁化学科技（上海）有限公司**  
 Tel: 021-6427-2302 Fax: 021-6486-5302  
 Tel: 010-8225-1765 Fax: 010-8225-1752