

FastPure Animal Tissue/Cell Genomic DNA Mini Kit Handbook FastPure 动物组织/细胞基因组小量提取试剂盒说明书（离心柱型）

产品组成

FastPure Animal Tissue/Cells Genomic DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1204-50T	EK-1204-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer GL	7mL	12mL
Buffer GE	60mL	120mL
Buffer GW	12mL	24mL
Buffer EB	10mL	20mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	550μL	1.1mL
RNase A Solution (20mg/mL)	300μL	600μL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本产品适合于从 5~50mg 动物组织或小于 5×10^6 培养细胞样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60min。得到的 DNA 可直接用于 PCR/Southern Blot 检测等实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K Solution 和 RNase A Solution 外，可在室温(15~25°C)保存 12 个月。低温下 Buffer GL 或 Buffer GE 可能会有沉淀形成，使用时需 55°C 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 溶液和 RNase A 溶液收到后请分装保存于 -20°C。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项：

- 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
- 若 Buffer GL 或 Buffer GE 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- Proteinase K Solution 和 RNase A Solution 建议分装保存于 -20°C，反复冻融会影响其活性。
- 小型高速离心机（~13000rpm）
- 水浴锅温度分别设置至 56°C 和 70°C。

开始前试剂准备

- 按瓶子标签所示，加入相应体积的无水乙醇稀释 Buffer GW，于室温密封保存。

操作步骤：

1. 请根据样品种类进行以下步骤（A 为培养细胞，B 为动物组织）

A. 培养细胞的消化裂解（细胞总量 $\leq 5 \times 10^6$ 个）

- （1）细胞消化完成后将细胞消化混合液 2300×g 离心 1min 收集细胞，小心移去培养液留下白色细胞沉淀。
- （2）加入 1mL PBS 溶液重悬细胞，2300×g 离心 1min，吸去上清溶液留下细胞沉淀。
- （3）加入 40μL PBS 溶液，用移液器吹打以重悬细胞。
- （4）加入 100μL Buffer GL，涡旋 15s 彻底混匀。
- （5）加入 10μL Proteinase K 溶液（20mg/mL）至样品中，再次涡旋 15s。
- （6）将样品置于 56°C 水浴 15min，然后 70°C 水浴 2min。
- （7）（可选）加入 5μL RNase A Solution 至消化液中，颠倒混匀，室温或 37°C 放

置 15min。

B. 动物组织的消化裂解 (5~50mg)

(1) 把 5~50mg 组织研磨或剪成尽量小的碎片, 转移至 1.5mL 离心管中。按顺序分别加入 50 μ L 1 \times PBS、50 μ L Buffer GL 和 10 μ L Proteinase K 溶液(20mg/mL), 涡旋混匀 15s。56 $^{\circ}$ C 水浴 30-60min (若组织块过大或消化慢可延长消化时间, 最长可过夜), 期间需颠倒混匀几次或震荡水浴。

注意: 适当的组织量才能获得理想结果。过多的样品会降低产量和纯度。脾、肝、肾等富含 DNA 的样品不宜超过 20mg, 肌肉和皮肤等可达 50mg。肌肉、皮肤、心肌等结缔组织较多的样本, 建议使用液氮研磨或机械匀浆, 否则消化极慢且容易堵柱。消化时间取决于样品类型和匀浆效果, 一般组织样品需 0.5-3h, 老鼠尾巴需 6-8h。过夜消化不影响后续的实验操作及最终结果。

(2) (可选) 加入 5 μ L RNase A Solution 至消化液中, 颠倒混匀, 室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 15min。

RNA 消化时间取决于样品类型, 肝、肾等富含 RNA, 需较长消化时间。

2. 加入 500 μ L Buffer GE 至消化液中, 充分涡旋混匀 15-20s 后室温静置 10min。

注意: 消化完成后应无组织碎片残留, 若有则 12000 \times g 离心 3min 弃去不溶物再执行步骤 2。

3. 把吸附柱套在 2mL 收集管中。将上一步骤所得溶液加入柱中, 12000 \times g 离心 1min。

倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

若柱子出现堵塞, 可提高转速至 14000 \times g 离心 3-5min。若总溶液体积超过 700 μ L 则分次上柱。

4. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GE, 12000 \times g 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GW (确认已加入相应体积无水乙醇), 12000 \times g 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

6. 重复步骤 5 一次。

7. 倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中, 最大转速 (~13,400 \times g) 离心 2min 以干燥吸附柱膜。将吸附柱套入新的 1.5mL 离心管中并置于室温放置 5-10min 彻底晾干。

注意: Buffer GW 中的乙醇残留会影响后续的酶反应实验。

8. 向吸附柱膜中央位置悬空滴加 50-100 μ L Buffer EB, 室温静置 2min 后, 最大转速 (~13,400 \times g) 离心 2min 收集 DNA 溶液并置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 洗脱体积不应小于 30 μ L, 体积过少会影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序, 需使用 ddH₂O 做洗脱液, 并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。为了提高 DNA 的回收量, 可将 Buffer EB 加热 (约 60 $^{\circ}$ C) 并洗脱两次, 可增加约 15-20% 得率。

常见问题:

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多:** 减少样品用量。富含核酸的样品如脾、肝、肺等用量可小于 20mg。
- **样品消化不充分:** 用液氮或研磨仪可提高样品消化效果, 延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **样品裂解不充分:** 重新提取, 加入 Buffer GL 后充分涡旋混匀。
- **消化液中存在不溶物质:** 若样品消化后存在明显颗粒, 于 12000 \times g 离心 3min 弃去不溶物。

2. RNA 污染:

- **样品 RNA 含量高:** 延长 RNase 消化时间至 60min。

3. DNA 纯度不达标:

- **样品裂解不充分:** 重新提取, 加入 Buffer GL 后充分涡旋混匀。
- **样品用量太多:** 减小用量。
- **复杂样品:** 对于一些富含代谢物质组织, 样品经裂解消化后, 用等体积酚氯仿抽提后再继续操作。

4. DNA 产量低

- **试剂准备有误:** Buffer GW 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **样品消化不充分:** 用液氮或研磨仪可提高样品消化效果, 延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。

5. DNA 降解 (拖尾严重)

- **样品反复冻融或组织取下后未及时处理:** 取出的组织应立即液氮深冻或存放在 RNA/DNA 稳定剂 (如 ES-8735 Simple Protect 通用型样本保存液) 中。