

目 录

简介----- 2

原理----- 2

保质期----- 2

试剂盒组成----- 3

准备工作----- 5

血液类样品

方案 1:血液和骨髓 DNA 提取方案----- 6

方案 2:血液 DNA 快速提取方案----- 9

方案 3:旧血 DNA 提取方案----- 10

方案 4:凝血 DNA 提取方案----- 11

方案 5:血液黄层 DNA 提取方案----- 12

组织细胞类样品

方案 6:动物组织 DNA 提取方案----- 14

方案 7:细胞 DNA 提取方案----- 16

方案 8:拭子 DNA 提取方案----- 18

方案 9:体液 DNA 提取方案----- 19

微生物类样品

方案 10:酵母 DNA 提取方案----- 20

方案 11:细菌 DNA 提取方案----- 21

常见问题回答----- 23

版本: 2024-01

简介

SolPure DNA Kits 采用改良盐析法纯化方式，为血液样品、组织样品、培养细胞、口腔拭子，细菌等样品的基因组 DNA 提取提供一种安全而经济的解决方法。提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需用到任何昂贵的试剂，是目前核酸抽提中最为经济的试剂盒。试剂盒对样品用量无限制，可灵活调节各种用量的样品。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切，Southern 杂交等实验。

- SolPure Blood DNA Kit 适合于从血液样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Tissue DNA Kit 适合于从动物组织中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Cell DNA Kit 适合于从培养细胞样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Buccal Cell DNA Kit 适合于从口腔脱落细胞，拭子中提取基因组 DNA。
- SolPure Bacterial DNA Kit 适合于从细菌样品中提取高分子量的基因组 DNA。
- SolPure Yeast DNA Kit 适合于从酵母或真菌样品中提取高分子量的基因组 DNA。

原理

SolPure DNA Kits 是改良的盐析法纯化方式。(血液样品在红细胞裂解液中裂解去除红细胞，离心收集白细胞)，组织、白细胞或培养细胞在裂解中裂解，DNA 释放到裂解液中，加入 RNase A 消化去除 RNA；加入高盐溶液至裂解液中盐析沉淀蛋白质和杂质；离心去除沉淀得到只含 DNA 的上清液，加入异丙醇沉淀回收 DNA；70%乙醇洗涤去除盐分，最后加入 Buffer TE 溶解 DNA。

保质期

SolPure DNA Kits 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。RNase A、Lysozyme、Lyticase、Proteinase K 和 Glycogen 室温运输，收到试剂盒后，取出 RNase A、Lysozyme、Lyticase、Proteinase K 和 Glycogen 并保存于 2-8℃。低温保存或运输过程中，Buffer WLB 可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。

组 成

SolPure Blood DNA Kit

产品编号	D3311-01	D3311-02	D3311-03
可处理的血液体积	50 ml	300 ml	1000 ml
10 × Buffer RBC	20 ml	2 × 50 ml	400 ml
Buffer VLB	60 ml	350 ml	2 × 550 ml
Buffer PPS	20 ml	120 ml	350 ml
Buffer TE	15 ml	60 ml	200 ml
说明书	1	1	1

SolPure Tissue DNA Kit

产品编号	D3312-01	D3312-02	D3312-03
可处理的组织量	1 g	5 g	50 g
Buffer VLB	40 ml	200 ml	2 × 900 ml
Buffer PPS	15 ml	70 ml	600 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	30 ml
RNase A	5 mg	20 mg	200 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
说明书	1	1	1

SolPure Cell DNA Kit

产品编号	D3313-01	D3313-02	D3313-03
可处理的细胞数量	2×10^8	2×10^9	2×10^{10}
Buffer VLB	40 ml	300 ml	2 × 900 ml
Buffer PPS	15 ml	100 ml	600 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	30 ml
RNase A	5 mg	20 mg	200 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
说明书	1	1	1

组 成

SolPure Buccal Cell DNA Kit

产品编号	D3315-01	D3315-02	D3315-03
可处理的组织量	100 Preps	500 Preps	1000 Preps
Buffer VLB	40 ml	200 ml	400 ml
Buffer PPS	15 ml	70 ml	130 ml
Glycogen Solution	60 µl	300 µl	600 µl
RNase A	5 mg	20 mg	40 mg
Buffer TE	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1

SolPure Yeast DNA Kit

产品编号	D3322-00	D3322-01	D3322-02
处理次数	10 次	100 次	500 次
Buffer VLB	5 ml	40 ml	180 ml
Buffer PPS	2 ml	15 ml	60 ml
Lyticase	250 ul	2.2 ml	11ml
Buffer SE	5 ml	40 ml	180ml
RNase A	3 mg	10 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8ml	5 ml	15 ml
Buffer TE	3 ml	15 ml	120 ml
说明书	1	1	1

SolPure Bacterial DNA Kit

产品编号	D3314-01	D3314-02	D3314-03
处理次数	100 次	500 次	2000 次
Buffer VLB	80 ml	350 ml	3 × 500ml
Buffer PPS	30 ml	120 ml	500 ml
Lysozme	120 mg	600 mg	4 × 600 mg
RNase A	5 mg	20 mg	100 mg
Buffer TE	30 ml	200 ml	500 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 70%乙醇
- 异丙醇
- 灭菌的 1.5ml 离心管，或 15ml 离心管，或 50ml 离心管
- $<15,000 \times g$ 小型离心机，或适合 15ml/50ml 离心管的离心机($2,000 \times g$)
- 用灭菌水把 10 x Buffer RBC 稀释成 1 x Buffer RBC，并于室温保存。
- Lysozyme 的配制(50mg/ml): Lysozyme 以干粉提供，使用前须加入适量的 Buffer TE 溶解，使其终浓度为 50mg/ml。溶解后，分装保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
- 溶解 Lyticase (5U/ μl): 加入 Buffer SE 溶解 Lyticase 至终浓度为 5U/ μl 。Lyticase 干粉在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存一年，但溶解的 Lyticase 须保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存一年，溶解的 Proteinase K 须保存于 -20°C 。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 或 Buffer AE 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml，颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存，但溶解的 RNase A 须保存于 -20°C 。

方案 1. 血液和骨髓 DNA 提取(D3311)

该方案适合于从↓300μl, ⊕3ml 或 ⊕10ml, 或其它体积的抗凝全血和骨髓样品中提取高分子量基因组 DNA, 按下表的比例加入各种试剂。

血液体积	300μl	400μl	500μl	1ml	2ml	3ml	10ml
1 x Buffer RBC	900μl	1.2ml	1.5ml	3ml	6ml	9ml	30ml
Buffer VLB	300μl	400μl	500μl	1ml	2ml	3ml	10ml
Buffer PPS	100μl	133μl	167μl	333μl	667μl	1ml	3.3ml
异丙醇	300μl	400μl	500μl	1ml	2ml	3ml	10ml
70%乙醇	300μl	400μl	500μl	1ml	2ml	3ml	10ml
Buffer TE	100μl	100μl	100μl	200μl	200μl	250μl	1ml

裂解红细胞

1. 吸取↓900μl 1 x Buffer RBC 至 1.5ml 离心管; ⊕9ml 1 x Buffer RBC 至 15ml 离心管; 或 ⊕30ml 1 x Buffer RBC 至 50ml 离心管中。
注: 10 x Buffer RBC 使用前须用灭菌水稀释 10 倍。
2. 加入↓300μl、⊕3ml、或 ⊕10ml 全血或骨髓样品至装有 1 x Buffer RBC 的离心管中, 颠倒 10-15 次混匀。
3. 室温放置↓1 分钟、⊕5 分钟、或⊕5 分钟, 期间颠倒混匀 2-3 次。
注: 处理 1 小时前采取的血样时, 需放置 3 分钟以上, 以确保红细胞充分裂解。
4. ↓13,000 x g 离心 1 分钟, ⊕2,000 xg 离心 5 分钟, ⊕2,000 xg 离心 5 分钟。
5. 倒弃或吸弃上清液, 剩余↓~30μl, ⊕~200μl, 或⊕~200μl 溶液和白细胞沉淀。

裂解白细胞

6. 剧烈涡旋让白细胞沉淀在残液中充分分散。
7. 加入↓300μl, ⊕3ml, 或 ⊕10ml Buffer VLB 至白细胞重悬液中。立即用移液枪

吸打或剧烈涡旋 30 秒裂解细胞。若吸打或涡旋后有团状物，37℃水浴 1-2 小时使之溶解。

去除 RNA 污染

8. (可选) 若需去除 RNA，加入↓1.5μl，⌚15μl，或⌚50μl RNase A（另外订购）至裂解液中。颠倒混匀，37℃温育 15-60 分钟。冰上放置↓1 分钟，⌚3 分钟，或⌚3 分钟冷却样品。

去除蛋白质

9. 加入↓100μl，⌚1ml，或⌚3.33ml Buffer PPS，最高速度涡旋混匀 30 秒。
10. ↓13,000-16,000 × g 离心 1 分钟，⌚2,000 × g 离心 5 分钟，或 ⌚2,000 × g 离心 5 分钟。
- 注：离心后会形成紧密的蛋白沉淀。若沉淀不紧密，以最快速度涡旋混匀 30 秒，冰上放置 5 分钟。重复此步离心去除蛋白质。

沉淀 DNA

11. 吸取↓300μl 异丙醇至 1.5ml 离心管中；或⌚3ml 异丙醇至 15ml 离心管中；或⌚10ml 异丙醇至 50ml 离心管中。
12. 把第 10 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
13. ↓13,000-16,000 × g 离心 3 分钟，⌚2,000 × g 离心 5 分钟，或 ⌚2,000 × g 离心 5 分钟。
14. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。

乙醇脱盐和干燥

15. 加入↓300μl，⌚3ml，或⌚10ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒或涡旋洗涤 DNA 沉淀。
16. ↓13,000-16,000 × g 离心 1 分钟，⌚2,000 × g 离心 5 分钟，或 ⌚2,000 × g

离心 5 分钟。

17. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。

18. 空气干燥↓5 分钟，☉5 分钟，或☉15 分钟。

溶解 DNA

19. 加入↓100 μ l，☉250 μ l，或 ☉1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀团中。涡旋 5 秒。65℃ 温育↓30 分钟，☉1 小时，或☉1 小时溶解 DNA。

20. 室温或 2-8℃ 放置过夜使 DNA 充分溶解。把 DNA 保存于 2-8℃ 或-20℃。

方案 2:血液 DNA 快速抽提方案(D3311)

该方案是专门为处理 10ml 血液样品 DNA 提取优化的方案，它能更加高效快速地从血液样品提取 DNA。该方案也可以适当调节溶液用量来处理其它体积的血液样品。

1. 吸取 30ml 1 × Buffer RBC 至 50ml 离心管中。
注：10 × Buffer RBC 使用前须用灭菌水稀释 10 倍。
2. 转移 10ml 血液样品至装有 RBC 的离心管中。颠倒混匀 10 次，室温静置 5 分钟，其间颠倒混匀 2-3 次。
3. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀白细胞。倒弃上清液，反扣于吸水纸吸尽残液。(注意不要丢失白细胞沉淀)
4. **加入 3.33ml Buffer PPS 至白细胞沉淀中**，最快速度涡旋 30 秒重悬白细胞。
5. **加入 10ml Buffer WLB 至样品中**。最快速度涡旋混匀 2 分钟。
6. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀去除蛋白质。
7. 转移 10ml 异丙醇至 50ml 离心管中。
8. 把第 6 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
9. 2,000 × g 离心 5 分钟沉淀 DNA。
10. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。
11. **加入 10ml 70%乙醇**，颠倒洗涤 DNA 沉淀。
12. 2,000 × g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。**空气干燥 10 分钟**。
倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
14. 加入 1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。65℃温育 1 小时溶解 DNA。
15. 室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 3: 旧血样品的 DNA 提取(D3311)

血液在室温(15-25℃)超过 24 小时,或 2-8℃放置时间超过 5 天后,血液样品中可能会出现溶血现象或会存在凝固的小块,最好采用该方案进行操作,以提高 DNA 的产量。该方案也可以适当调整处理其它体积的血液样品。

1. 吸取 30ml 1 × Buffer RBC 至 50ml 离心管中。**加入 10ml 全血样品至离心管中。**颠倒混匀 10 次。室温静置 5 分钟,期间颠倒混匀 2-3 次。
2. 2,000 × g 离心 5 分钟。小心吸弃上清液,剩余 3.5ml 上清液和沉淀。
3. 涡旋让沉淀在残液中充分重悬。
4. **加入 10ml Buffer WLB 至重悬液中。**涡旋混匀 30 秒。37℃水浴 2 小时或过夜,以确保细胞的充分裂解。
5. 加入 50μl RNase A (另外订购),颠倒混匀 10 次。37℃水浴 15-60 分钟。
6. 冰上放置 5 分钟冷却样品。
7. **加入 4.5ml Buffer PPS 至裂解液中。**最高速度涡旋 30 秒。
8. 2,000 × g 离心 10 分钟。
9. 吸取 13.5ml 异丙醇至 50ml 离心管。
10. 小心把第 8 步的上清液倒入离心管中。颠倒离心管 30-50 次。2,000 × g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液,把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。
12. 加入 10ml 70%乙醇至 DNA 沉淀团。颠倒混匀。2,000 × g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液,把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。空气干燥 10 分钟。
14. 加入 500μl Buffer TE 至 DNA 沉淀团中。涡旋 5 秒。
15. 65℃温育 1 小时溶解 DNA,室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 4: 凝固血液 DNA 抽提(D3311)

该方案适合于从④50 μ l 或④1ml 凝固的血液中提取 DNA。该方案需另外准备一管 Proteinase K(20mg/ml)、RNase A 和 Glycogen(20mg/ml)。

1. 转移④50 μ l 凝血样品和 550 μ l Buffer WLB 至④ 1.5ml 离心管中；或转移④1ml 凝血样品和 11ml Buffer WLB 至 50ml 离心管中。
2. 加入④3 μ l, 或④60 μ l Proteinase K (20mg/ml)至样品中。颠倒 15 次。
3. 55℃振荡水浴 3 小时至过夜, 或直至所有颗粒都完全消化。
4. 加入④3 μ l 或④60 μ l RNase A 至样品中。颠倒混匀, 37℃水浴 15 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟冷却裂解液。
6. 加入④200 μ l, 或④4ml Buffer PPS 至裂解液中。最快速度涡旋 30 秒, 冰上放置 10 分钟。
7. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离 3 分钟, 或④2,000 $\times$ g 离心 10 分钟。
8. 吸取④ 600 μ l 异丙醇和 1 μ l Glycogen(20mg/ml)至 1.5 ml 离心管中；或④12ml 异丙醇和 20 μ l Glycogen(20mg/ml)至 50ml 离心管中。
9. 把第 7 步的上清液转移至装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。
10. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离心 5 分钟, 或④ 2,000 $\times$ g 离心 10 分钟沉淀 DNA。
11. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。
12. 加入④ 600 μ l 或④12ml 70%乙醇至样品中。颠倒混匀数次。
13. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离心 1 分钟, 或④2,000 $\times$ g 离心 5 分钟。
14. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸吸干残留溶液。空气干燥④ 10 分钟或④15 分钟。
15. 加入④20 μ l 或④0.4ml Buffer TE 至 DNA 沉淀。涡旋 5 秒。65℃温育④ 30 分钟或④1 小时溶解 DNA。室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 5: 血液黄层 DNA 提取(D3311)

该方案适合于从血液黄层样品(Buffy Coat)中提取基因组 DNA。

血液黄层(Buffy Coat)及其制备

1. 取抗凝血液至合适的离心管中。室温下(15-25℃), 1100×g 离心 10 分钟后, 形成明显的三层结构: 澄清的上层液为血浆, 中间层就是血液黄层(Buffy Coat), 含浓缩的淋巴细胞, 而最下层则为富集的红细胞。血液黄层含有浓缩的淋巴细胞, 相同体积的血液黄层的 DNA 产量是血液的 5-10 倍。转移 0.1-0.2 倍的黄层样品至新的离心管中。(举例: 3ml 抗凝血液可获得 300-600μl 的血液黄层)
2. 冻藏的血液黄层(Buffy Coat)样品须于 37℃ 振荡水浴快速解冻。解冻后放置于冰上等待使用。

红细胞的去除

3. 吸取 150-300μl 血液黄层至 15ml 离心管中。加入 3 倍体积 1×Buffer RBC 至样品中。颠倒混匀 5-10 次。室温放置 10 分钟, 期间颠倒混匀 2-3 次。
注: 试剂盒提供 10×Buffer RBC, 使用前必须用灭菌水稀释 10 倍才能使用。
4. 2,000×g 离心 5 分钟沉淀白细胞。小心倒弃或吸弃上清液, 剩余~200μl 残液和细胞沉淀。

裂解和纯化

5. 剧烈涡旋 15 秒让白细胞在残液中充分重悬。
6. **加入 3ml Buffer WLB 至细胞重悬液中。**立即用移液枪吸打几次或剧烈涡旋 30 秒。若吸打或涡旋后还有细胞团块, 37℃ 温育 2 小时使之消失。
7. 加入 15μl RNase A (另外订购) 至裂解液中。颠倒 25 次混匀。37℃ 温育 15-60 分钟。冰上放置 3 分钟冷却样品。
8. **加入 1ml Buffer PPS 至裂解液中。**最高快速度涡旋混匀 30 秒。
9. 2,000×g 离心 10 分钟沉淀蛋白质。
10. 吸取 3ml 异丙醇至 15ml 离心管中。

11. 小心把第 9 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
12. 2,000 × g 离心 5 分钟。
13. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸干残液。
14. 加入 3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀数次。
15. 2,000 × g 离心 5 分钟。
16. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥 10 分钟。
17. 加入 250μl Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。65℃温育 1 小时溶解 DNA。
18. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 6. 动物组织 DNA 提取(D3312)

该方案适合于从各种动物组织样品中提取高分子量基因组 DNA。根据下表调整试剂用量就可以处理不同用量的组织。

溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml。溶解的 Proteinase K 须保存于-20℃，保质期为一年。

组织用量	10mg	20mg	30mg	50mg	100mg
Buffer WLB	300μl	600μl	900μl	1.5ml	3ml
Proteinase K	1.5μl	3μl	4.5μl	7.5μl	15μl
RNase A	1.5μl	3μl	4.5μl	7.5μl	15μl
Buffer PPS	100μl	200μl	300μl	500μl	1ml
异丙醇	300μl	600μl	900μl	1.5ml	3ml
70%乙醇	300μl	600μl	900μl	1.5ml	3ml
Buffer TE	100μl	200μl	300μl	500μl	1ml

1. 剪取① 5-10mg, 或② 50-100mg 动物组织, 用液氮将样品研磨成粉末状。把样品转移至 1.5ml 离心管或 15ml 离心管中。
除液氮研磨外, 其它匀浆方法, 如玻璃匀浆器匀浆, 一次研磨棒等都可以使用, 对于富含多糖类物质海洋生物样品, 样品量不要超过① 5mg 或② 50mg。
2. 加入① 300μl 或② 3ml Buffer WLB 至装有样品的离心管中。颠倒混匀。
3. 加入① 2μl 或② 20μl Proteinase K 至裂解液中。颠倒混匀, 55℃水浴 1~3 小时或直至组织样品完全消化。
4. 加入① 2μl 或② 20μl RNase A 至裂解液中。颠倒混匀, 37℃水浴 15~60 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟冷却样品。
6. 加入① 100μl 或② 1ml Buffer PPS 至裂解液中。最高速度涡旋 30 秒。
对于富含多糖类物质海洋生物样品, 样品涡旋混匀后, 冰上静置 15 分钟让杂质更充分析出。
7. ① 13,000-16,000 × g 离 3 分钟, 或② 2,000 × g 离心 10 分钟。

8. 吸取④300 μ l 异丙醇至 1.5ml 离心管；或④3ml 异丙醇至 15 离心管中。
9. 把第 7 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
10. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离心 3 分钟，或④ 2,000 $\times$ g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。
12. 加入④300 μ l 或④3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀数次。
13. ④13,000-16,000 $\times$ g 离心 1 分钟，或④2,000 $\times$ g 离心 3 分钟。
14. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥④10 分钟或④15 分钟。
15. 加入④100 μ l 或④1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
16. 65℃温育 1 小时溶解 DNA。
17. 室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 7: 培养细胞 DNA 提取(D3313)

该方案适合于从 $1-2 \times 10^6$, 或 $1-2 \times 10^7$ 个培养细胞中提取高分子量基因组 DNA。

溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml。溶解的 Proteinase K 须保存于 -20°C 。

1. 收集细胞

a). 悬浮培养细胞: 计算细胞数量, 按第 2 步进行操作。

b). 贴壁培养细胞: 计算细胞数量, 采用胰酶消化或用细胞刮收集细胞。

胰酶处理: 吸弃培养液, 用 PBS 洗涤细胞, 然后加入含 0.1-0.25%胰酶(trypsin)的 PBS。当细胞完全脱落后, 按第 2 步进行操作;

细胞刮: 用细胞刮把细胞从培养瓶或培养皿刮下, 然后按第 2 步进行操作;

2. 转移含 $1-2 \times 10^6$ 或 $1-2 \times 10^7$ 个细胞培养液或胰酶消化液至 1.5ml 离心管或 15ml 离心管中。
3. $13,000-16,000 \times g$ 离心 5 秒, 或 $500 \times g$ 离心 5 分钟收集细胞。
4. 小心吸弃或倒弃培养液, 剩余 $20\mu\text{l}$ 或 $200\mu\text{l}$ 液体和细胞。
5. 剧烈涡旋或用移液枪吸打, 使细胞在残液中充分重悬分散。
6. 加入 $300\mu\text{l}$ 或 3ml Buffer WLB 至重悬细胞中。最高速度涡旋 10 秒或用移液枪吸打混匀 5~10 次。
7. 加入 $2\mu\text{l}$ 或 $20\mu\text{l}$ Proteinase K 至裂解液中。颠倒混匀, 55°C 水浴 30~60 分钟。
8. 加入 $2\mu\text{l}$ 或 $20\mu\text{l}$ RNase A 至裂解液中。混匀, 37°C 水浴 20 分钟。
9. 冰上放置 3 分钟冷却样品。
10. 加入 $100\mu\text{l}$ 或 1ml Buffer PPS 至裂解液中。最快速度涡旋 20 秒。
11. $13,000-16,000 \times g$ 离 5 分钟, 或 $2,000 \times g$ 离心 10 分钟。
12. 吸取 $300\mu\text{l}$ 异丙醇至 1.5ml 离心管; 或 3ml 异丙醇至 15ml 离心管中。
13. 把第 11 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次或直

至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。

14. ④ 13,000-16,000 × g 离心 3 分钟，或④ 2,000 × g 离心 10 分钟。
15. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。
16. **加入④300μl 或④3ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。**颠倒混匀数次。
17. ④13,000-16,000 × g 离心 1 分钟，或④2,000 × g 离心 3 分钟。
18. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸尽残液。空气干燥④10 分钟或④15 分钟。
19. **加入④100μl 或④1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。**涡旋 5 秒。
20. 65℃温育 1 小时溶解 DNA。
21. 室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 8. 拭子 DNA 提取(D3315)

该方案适合于从 1 个口腔拭子中提取 DNA。

1. 收集口腔细胞：用拭子在口腔内来回刮 10 次；(取样前 1 小时内最好不要吃喝)
2. **加入 300 μ l Buffer WLB 至 1.5ml 离心管中。**用剪刀或镊子把拭子的头部转移至离心管中。
3. 选择一种方法来裂解样品；
 - a). 65 $^{\circ}$ C 水浴 15-60 分钟；
 - b). **最高产量：**加入 15 μ l Proteinase K（另外订购）至裂解液中。颠倒混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。
4. 加入 1.5 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 15-60 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟；取出拭子，并在离心管边缘挤压以尽量回收溶液，去除拭子。
6. **加入 100 μ l Buffer PPS 至裂解液中。**高速涡旋 20 秒，冰上放置 5 分钟。
7. 13,000-16,000 $\times$ g 离 3 分钟。
8. **吸取 300 μ l 异丙醇和 0.5 μ l 糖原(Glycogen)至新的 1.5ml 离心管中，**把第 7 步获得的上清液倒入离心管中。
9. 颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。13,000-16,000 $\times$ g 离心 5 分钟。
10. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
11. 加入 300 μ l 70%乙醇至沉淀中。混匀，13,000-16,000 $\times$ g 离心 3 分钟。
12. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上。空气干燥 5 分钟。
13. 加入 20 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
14. 65 $^{\circ}$ C 温育 10-30 分钟溶解 DNA。

方案 9: 体液 DNA 抽提(D3315)

该方案适合于从④ 50 μ l 或⑤ 1ml 体液(如唾液, 血清, 尿液, 全血, 奶汁)中提取 DNA。

1. 加入④ 550 μ l Buffer WLB 至④ 1.5ml 离心管中, 或加入⑤ 5ml Buffer WLB 至 15ml 离心管中。
2. 转移④ 50 μ l 或⑤ 1ml 体液样品至装有裂解液的离心管中。
3. 加入④ 1.5 μ l 或⑤ 15 μ l Proteinase K (另购) 至裂解液中混匀, 55℃ 水浴 1-3 小时。
4. 加入④ 1.5 μ l 或⑤ 15 μ l RNase A 至裂解液中。混匀, 37℃ 水浴 15 分钟。
5. 冰上放置 3 分钟冷冻样品。
6. 加入④ 200 μ l 或⑤ 2ml Buffer PPS 至裂解液中。涡旋 30 秒, 冰上放置 5 分钟。
7. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离 3 分钟, 或⑤ 2,000 $\times$ g 离心 10 分钟。
8. 吸取④ 600 μ l 异丙醇和 0.5 μ l Glycogen 至 1.5ml 离心管; 或⑤ 6ml 异丙醇和 10 μ l Glycogen 至 15ml 离心管中。
9. 把第 7 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30-50 次。室温静置 5 分钟。
10. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离心 5 分钟, 或⑤ 2,000 $\times$ g 离心 10 分钟。
11. 小心倒弃上清液, 并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。
12. 加入④ 600 μ l 或⑤ 6ml 70%乙醇至 DNA 沉淀中。颠倒混匀几次。
13. ④ 13,000-16,000 $\times$ g 离心 1 分钟, 或⑤ 2,000 $\times$ g 离心 3 分钟。
14. 小心倒弃上清液, 并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。空气干燥④ 10 分钟, 或⑤ 15 分钟。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
15. 加入④ 20 μ l, 或⑤ 0.1ml Buffer TE(10Mm Tris, pH8.0), 涡旋 5 秒。65℃ 温育④ 30 分钟, 或⑤ 1 小时溶解 DNA。
16. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

方案 10. 酵母 DNA 提取(D3322)

该方案适合于从 1ml 培养过夜的酵母培养液($1\sim 2 \times 10^8$)中提取酵母基因组 DNA。

- **溶解 Lyticase (5U/ μ l):** 加入 Buffer SE 至 Lyticase 干粉中至终浓度为 5U/ μ l。溶解的 Lyticase 须保存于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。

- **2-巯基乙醇**

1. 准备过夜培养的酵母培养液，约含 $1\sim 2 \times 10^8$ 个酵母细胞。转移 1ml 酵母培养液至 1.5ml 离心管。13,000~16,000 $\times g$ 离心 10~15 秒收集酵母细胞。
2. 加入 300 μ l Buffer SE、10 μ l 2-巯基乙醇和 20 μ l Lyticase(5U/ μ l)至酵母细胞中。用移液枪吸打几次重悬酵母细胞， 37°C 振荡温育 60~120 分钟消化细胞壁。
3. 13,000~16,000 $\times g$ 离心 60 秒收集酵母原生质体，小心倒弃或吸弃溶液。
4. 加入 300 μ l Buffer VLB，最高速度涡旋 20 秒或用移液枪吸打混匀 5~10 次， 90°C 温育 20 分钟裂解细胞。
5. 恢复至室温，加入 5 μ l RNase A，混匀，室温放置 20-60 分钟。
6. 加入 100 μ l Buffer PPS 至裂解液中。高速涡旋 15 秒。13,000-16,000 $\times g$ 离 3 分钟。
7. 吸取 300 μ l 异丙醇至新的 1.5ml 离心管中，把第 6 步获得的上清液倒入离心管中。颠倒离心管 30~50 次，13,000-16,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
8. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
9. 加入 300 μ l 70%乙醇至沉淀中。混匀，13,000-16,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
10. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上。空气干燥 5 分钟。
11. 加入 100 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
12. 65°C 温育 10~30 分钟溶解 DNA。
13. (可选) 高分子量基因组 DNA)室温轻轻振荡过夜充分溶液 DNA。

方案 11: 细菌 DNA 提取(D3314)

该方案适合于从 $<1.5 \times 10^9$ 细菌中提取 DNA。更多数量的细菌也可以使用，只需相应地扩大各种试剂的用量即可。

lysozyme 的配制(50mg/ml): lysozyme 以干粉提供,使用前须加入适量的 Buffer TE 溶解,使其终浓度为 50mg/ml。溶解后,分装保存于 2-8℃。

1. 样品的裂解

A. 革兰氏阴性细菌的裂解

A1. 转移 0.5ml 细菌培养液($<1.5 \times 10^9$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中;

A2. $13,000-16,000 \times g$ 离心 30 秒收集细菌;小心倒弃上清液;

A3. 加入 600 μ l Buffer WLB, 涡旋或吸打重悬细菌;

A4. 80℃水浴 10 分钟裂解细菌;

A5. 其余按第 2 步进行操作。

B. 革兰氏阳性细菌的裂解

B1. 转移 0.5ml 细菌培养液($<1.5 \times 10^9$ 个细菌)至 1.5ml 离心管中。

B2. $13,000-16,000 \times g$ 离心 30 秒收集细菌;小心倒弃上清液。

B3. 加入 100 μ l Buffer TE/lysozyme (80 μ l+20 μ l)。涡旋重悬细菌, 37℃水浴 20 分钟消化细胞壁。

B4. 加入 500 μ l Buffer WLB 至样品中, 涡旋重悬细菌。

(可选)处理结核分杆菌、葡萄球菌或其它难裂解细菌时, 可加入 10 μ l Proteinase K (20mg/ml, 另外订购)至裂解液中, 颠倒混匀后, 65℃水浴 20 分钟消化去除细胞壁。

B5. 80~90℃水浴 20 分钟裂解细菌。

B6. 其余按第 2 步进行操作。

2. 加入 3 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀, 37℃水浴 15 分钟。

3. 冰上放置 3 分钟冷冻样品。
4. **加入 200 μ l Buffer PPS 至裂解液中**，最快速度涡旋 30 秒。
5. 13,000-16,000 $\times$ g 离 3 分钟。
6. **吸取 600 μ l 异丙醇至新的 1.5ml 离心管中**。
7. 把第 5 步获得的上清液倒入装有异丙醇的离心管中。颠倒离心管 30~50 次。
8. 13,000-16,000 $\times$ g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
9. **加入 600 μ l 70%乙醇至 DNA 沉淀中**，颠倒数次洗涤 DNA 沉淀。
10. 13,000-16,000 $\times$ g 离心 1 分钟。
11. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于吸水纸吸干残留的溶液，空气干燥 10 分钟。
12. 加入 50~100 μ l Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒，65 $^{\circ}$ C 温育 1 小时溶解 DNA。
13. 室温轻轻振荡过夜充分溶解 DNA。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
产量低或纯度低	
细胞没有充分裂解	加入 Buffer WLB 之前，必须涡旋让细胞沉淀团在残液中充分重悬。加入 Buffer WLB 后，吸打或涡旋后，细胞沉淀团还没有消失，用移液枪吸打 10-15 次或在 37℃ 水浴 10-60 分钟至沉淀团消失。
加入异丙醇后混匀不充分	加入异丙醇后，须颠倒混匀 30-50 次，或直至看到丝状的沉淀。
DNA 沉淀丢失	在倒弃上清液时，DNA 沉淀团被倒掉
蛋白质沉淀不完全	加入 PPS Solution 后，必须高速涡旋 20 秒，让蛋白质充分沉淀。
蛋白质沉淀被吸出	蛋白质沉淀不紧密，重复涡旋 20 秒，冰上放置 5 分钟，再离心去除蛋白质沉淀。
DNA 溶解不充分	室温或 2-8℃ 过夜让 DNA 充分溶解，其间偶尔颠倒混匀加速 DNA 的溶解。