

固定包埋组织 DNA 快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: ZP322

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP322-01 (50 次)	ZP322-02 (100 次)
裂解液 FTL	11 ml	20 ml
结合液 CB	11 ml	20 ml
抑制物去除液 IR	25 ml	50 ml
蛋白酶 K	1 ml	2×1 ml
漂洗液 W2	15 ml	2×15ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	30 ml
吸附柱 AC	50 个	100 个
收集管 (2ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

储存事项:

蛋白酶 K 在-20℃保存, 其他部分在室温储存 12 个月不影响使用效果。

产品介绍:

福尔马林固定或者石蜡包埋组织通过独特裂解液热处理和蛋白酶 K 共同作用迅速裂解细胞释放出基因组 DNA, 然后基因组 DNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤, 抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂, 也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7 ~ 1.9, 长度可达 30kb - 50kb, 可直接用于 PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

注意事项:

1. **所有的离心步骤均在室温完成**, 使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机, 如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇 (需要准备100%/80%/60%/40%不同浓度) 或者二甲苯。
3. 实验前将需要的水浴先预热到 37℃备用。
4. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, **避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
5. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱, 但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 - 20℃。DNA 如果需要长期保存, 可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 但是 EDTA 可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 将组织切片浸泡在二甲苯中脱蜡约 30 分钟（具体时间根据切片厚度调整）。
2. 将切片依次放入 100%乙醇/80%乙醇/60%乙醇/40%乙醇/去离子水，每个液体中浸泡 10 秒钟重新水化切片。（刚放入 100%乙醇时，应该见到切片变白。）
3. 显微镜观察下，用刀片切下拟提取 DNA 的目标组织，放入预先称重的 1.5ml 离心管。再次称重，计算出切片组织重量。
4. 在 25-50mg 组织中加入 200 μ l 裂解液 FTL,再加入 10 μ l 的蛋白酶 K 溶液 (20mg/ml)，**立即混匀**，混匀后置 37°C水浴过夜。
5. 再加入 10 μ l 的蛋白酶 K 溶液(10mg/ml)，混匀后 55°C水浴 1-2 小时。

此步骤后，不应该见到粗大的组织颗粒了。

6. 加入 220 μ l 结合液 CB **立刻涡旋振荡 5-10 秒充分混匀**后置 70°C水浴 10 分钟。（出现浑浊为正常现象。）
7. 冷却后加入 220 μ l 乙醇，**立刻涡旋振荡 15-30 秒充分混匀**，此时溶液应该变澄清，也可能会出现絮状沉淀。
8. 用 1 毫升的枪头吸取混合物，将混合物加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 60 秒，倒掉收集管中的废液。

注意：DNA 含量多则溶液比较粘稠而堵柱，可打开吸附柱盖后离心，仍离心不下去则吸出离心不下去的液体，继续往下做。另外也说明样品量过大了；如再做，应减少样品量。

9. 加入 500 μ l 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
10. 加入 700 μ l 漂洗液 W2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
11. 加入 500 μ l 漂洗液 W2，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
12. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 100 μ l 洗脱缓冲液 TE（洗脱缓冲液事先在 65-70°C水浴中预热效果更好），室温放置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

14. DNA 可以存放在 2-8°C，如果要长时间存放，可以放置在 - 20°C。

问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低	<p>*组织块太大，蛋白酶 K 消化不完全-建议：液氮研磨或者尽量将组织切成小块，或者延长蛋白酶 K 消化时间至过夜或者在原有消化基础上另加 20μl 蛋白酶 K 消化 1-2 小时。</p> <p>*蛋白酶 K 失效了-建议：收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。</p> <p>*裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-建议：加入结合液后，和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀；加入异丙醇后立即吹打或者涡旋混匀才加入吸附柱，如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。</p>
组织 DNA 降解了	*组织中核酸酶活性导致降解- 建议： 样品处理前妥善保存在 - 20°C，处理量不要过量。
未提取到 DNA	*漂洗液 W2 中忘记加无水乙醇- 建议： 第一次实验时，在漂洗液 W2 中加入指定量无水乙醇。
脱下来的 DNA 产量低	<p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇-建议：确保做了步骤 12，否则残留乙醇会影响洗脱效率。</p> <p>*使用了水或者其它非最佳液体代替洗脱缓冲液-建议：仔细阅读仔细阅读注意事项 5 和步骤 13 和只使用洗脱缓冲液 TE 洗脱。</p>
260 吸光值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值- 建议： 将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。</p> <p>*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应-建议：确保做了步骤 12，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。</p>