

Marine animal DNA Extraction Mini Kit

水生动物 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从 1~20mg 软体动物组织和小于 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 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

产品组份

产品编号	DNM324-01	DNM324-02	DNM324-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
DNA Extraction Mini Columns II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer TLW	3 ml	40 ml	180 ml
Buffer MBL	3 ml	40 ml	180 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2A	5 ml	12 ml	2 x 30 ml
RNase Solution	60 μ l	300 μ l	1.5 ml
Proteinase K	0.3 ml	1.1 ml	5.5 ml
Buffer EB	3 ml	20 ml	60 ml

保存条件

本产品除 RNase Solution 外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer TLW 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20~8℃。

准备事项

- 55℃和 70℃水浴锅
- Buffer W1A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

A. 动物组织的消化裂解(1~20mg)

1. 把 1~20mg 组织(或<10mg 肝脏、肺或脾脏)剪成尽量小的碎片，转移至 1.5ml 离心管中。加入 220 μ l Buffer TLW 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。55℃温浴 1~3 小时或过夜消化，期间颠倒混匀几次或振荡温浴。
2. 加入 5 μ l RNase Solution 至消化液中，涡旋混匀，室温放置 10 分钟。
(可选：有未消化物质，13,000 x g 离心 3 分钟，转移上清至新的 1.5ml 离心管中。)
3. 加入 250 μ l Buffer MBL 至消化液中，高速涡旋 15 秒。70℃水浴 10 分钟。按过柱纯化进行操作。

B. 色素丰富组织样品（肠道内容物及内脏等）：

1. 把 20~50mg 组织处理成尽量小的碎片，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 600 μ l Buffer TLW 和 20 μ l Proteinase K，混匀。55℃振荡温浴 1~3 小时或过夜，若无振荡温浴，每隔 20 分钟颠倒混匀数次。
3. 加入 5 μ l RNase Solution 至消化液中，颠倒混匀。室温静置 15 分钟。
4. 加入 600 μ l 酚氯仿异戊醇(25:24:1)至裂解液中，用手剧烈振荡 30 秒。
5. 13,000 x g 离心 10 分钟。转移 500 μ l 上清液至新的 2.0ml 离心管中。
6. 加入 500 μ l Buffer MBL 和 500 μ l 无水乙醇至上清液中，涡旋混匀 15 秒。按过柱纯化第 2 步进行操作。

过柱纯化

1. 加入 250 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。
若加入乙醇时会有沉淀形成，用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。
2. 把 DNA Extraction Mini Columns II 装在 2ml 收集管中。转移获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
3. 重复第 2 步直至所有混合液充分过柱。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W1A 至柱子中。12,000 \times g 离心 10 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W2A 至柱子中。12,000 \times g 离心 10 秒。
6. 重复第 5 步一次。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。
8. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 将洗脱液重新加至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C。

解决方案

1. 柱子堵塞

- **样品消化不充分:** 用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆, 提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer MBL 混匀不充分。重新提取, 加入 Buffer MBL 后先颠倒混匀 3~5 次, 然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer MBL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质:** 若样品消化后仍存在明显的颗粒, 于 $12,000 \times g$ 离心 3 分钟去除未消化的物质。

2. DNA 产量低

- **样品消化不充分:** 延长消化时间让样品充分消化, 用玻璃匀浆器对样品进行匀浆。
- 样品中 DNA 含量低, 用富含核酸的肝脏/脾脏来提取。
- Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。