

DNAiso Reagent (基因组 DNA 提取试剂)

使用说明书

Takara Code : D305A

包装量 : 100 ml

Shipping at RT
Stored at RT

制品说明

本制品是一种简单、快速的基因组DNA (Genomic DNA) 提取试剂，可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞中提取基因组DNA。样品在DNAiso Reagent中能够充分被裂解，在加入乙醇后，会出现白色絮状的基因组DNA沉淀，收集并洗涤沉淀即可得到基因组DNA。

DNAiso Reagent具有很强的广谱性，可以适用于各种样品的基因组DNA提取。提取过程简单、快速，整个操作可以在30分钟内完成。本制品采用的是传统的缠绕法提取DNA，所获得的基因组DNA纯度高、完整性好。提取的基因组DNA可以直接用于PCR反应、Southern杂交、构建基因组DNA文库以及RAPD、AFLP、RFLP分析等各种分子生物学实验。

制品内容

DNAiso Reagent*	100 ml
-----------------	--------

* : DNAiso Reagent中含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

【本试剂之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇和75%乙醇。
- ◆ 8 mM NaOH。低浓度NaOH溶液在空气中很容易被CO₂中和，NaOH一般配制成2~4 M的储存液，使用时再稀释，其保存时间不超过6个月，而8 mM NaOH的保存期限不超过一个月。
- ◆ Chloroform (植物DNA提取时用) 。

操作注意事项

若要提取出完整度较高的基因组DNA，应尽量减少由于外力剪切作用对基因组DNA造成的损伤，在提取过程中应使用前端开口较大的移液枪头（实验前用灭菌的剪刀将移液枪头前端剪掉2~3 mm）。提取过程中要小心操作，避免剧烈振荡或使用振荡器。

实验操作

1. 各种组织材料的DNAiso用量及裂解方法如下。

实验材料种类	DNAiso 用量	裂解方法
贴壁培养细胞	1.0 ml/10 cm ² 培养皿	移液枪轻轻吹打
悬浮培养细胞	1.0 ml/1~3×10 ⁷ 细胞	移液枪轻轻吹打
动物组织	1.0 ml/25~50 mg 组织	匀浆器匀浆或液氮研磨
少量动物软组织(如脾脏和脑等)	1.0 ml/5~10 mg 组织	移液枪轻轻吹打
Yeast 或 革兰氏阳性菌	1.0 ml/1~3×10 ⁸ 细胞	先用溶菌酶裂解细胞壁，再加DNAiso 吹打裂解或使用液氮研磨
革兰氏阴性菌	1.0 ml/1×10 ⁹ 细胞	移液枪轻轻吹打

2. 实验样品的研磨和匀浆。

A. 贴壁培养细胞。

- ① 倒出培养液，用1×PBS清洗一次。
- ② 每10 cm²生长的培养细胞中加入1 ml的DNAiso Reagent，

水平放置片刻，使裂解液均匀分布于细胞表面并轻轻晃动培养皿使细胞裂解，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落（对于贴壁牢固的培养细胞可使用细胞刮勺刮离细胞）。

- ③ 将含有细胞的裂解液转移至离心管中，用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温静置5分钟。

B. 悬浮培养细胞 (或革兰氏阴性菌)

- ① 将悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中，8,000×g 4℃离心2分钟，弃上清。
- ② 加入1 ml(1×10⁷个悬浮培养细胞或1×10⁹个革兰氏阴性菌细胞的使用量)的DNAiso Reagent。
- ③ 用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
- ④ 室温静置5分钟。

C. 动物组织

- ① 将动物组织放入匀浆器中，每25~50 mg组织中加入1 ml DNAiso Reagent。
- ② 使用匀浆器反复匀浆，直至没有明显块状组织沉淀。
- ③ 对于特殊样品，如心脏、肌肉及软组织等，可以将其迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状（无明显的可见颗粒，如果没有研磨彻底会影响DNA的收率和质量）。加入适量的DNAiso Reagent，将研磨成粉末状的样品完全覆盖，然后室温静置，直至样品完全融化，再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状。对于量少的一些软组织（5~10 mg），例如脾脏、脑等，可以直接剪成小块放到离心管中加入DNAiso Reagent，再使用移液枪反复吹打，使软组织破碎，直至看不到明显的沉淀为止。
- ④ 将裂解液转移至离心管中。

D. 植物材料 (或革兰氏阳性菌)

- ① 将植物材料 (或革兰氏阳性菌) 称重后，放入研钵中加入液氮速冻，用研杵将植物材料 (或革兰氏阳性菌) 研磨成粉末状。
- ② 加入适量的DNAiso将粉末状样品完全覆盖，室温静置，直至样品完全融化，再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状。
- ③ 将裂解液转移至离心管中。

3. 除杂质。

- ① 离心：组织裂解液经10,000×g 4℃或室温离心10分钟，将上清转移至新的离心管中。此步骤可以除去裂解液中大部分的组织碎片、RNA和多糖类成份。（对于大量的动物组织、植物材料以及其他纤维或RNA含量较多的材料，推荐使用此操作，其他材料可酌情省略。）
- ② 本步骤选择使用（仅在提取植物材料时使用，可以除去大量叶绿素）：向组织裂解液中加入等体积的氯仿，颠倒混匀，室温静置10分钟，12,000×g 室温离心10分钟，将上层溶液转移至新的离心管中。

4. 基因组DNA的提取。

向上述裂解液中加入DNAiso Reagent 1/2体积量的无水乙醇。反复颠倒混匀1~3分钟，会出现云雾状的DNA沉淀，使用枪头将DNA缠绕出来转移至新的离心管中，或者将上清液轻轻倒出，将DNA沉淀留在离心管底部。若没有出现DNA沉淀或沉淀量较少且分散时，可以4,000×g室温离心2分钟沉淀DNA。

5. 基因组DNA沉淀的清洗。

缓慢地沿离心管壁加入1 ml 75%的乙醇（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，12,000×g 4℃离心5分钟后小心弃

去乙醇(为了更好地控制DNA中的盐离子含量,应尽量除净乙醇)。

6. 基因组DNA的溶解。

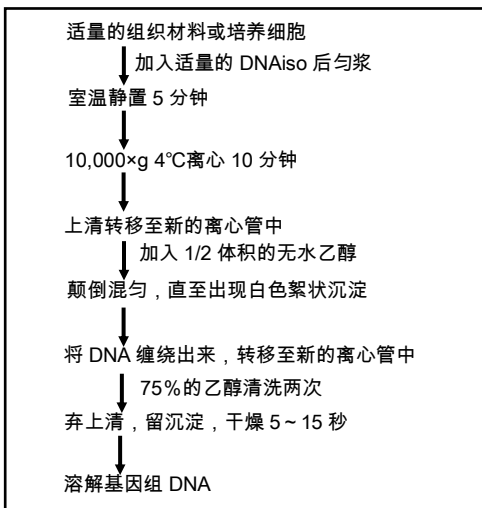
将除去乙醇后的基因组DNA沉淀在室温下干燥5~15秒(如果基因组DNA在空气中干燥时间过长,会很难溶解),缓慢加入适量的TE Buffer (pH8.0)或灭菌水溶解基因组DNA。一般从10⁷个细胞或10~20 mg动物组织中提取的基因组DNA加入200~300 μl溶液溶解,浓度可以达到200~300 ng/μl。从一些动物组织如肝脏、肌肉和植物中提取的基因组DNA通常会含有一些不溶的成份(多为多糖多酚类物质),可以通过12,000×g离心10分钟除去。

7. 使用8 mM NaOH促进DNA完全溶解。

当基因组DNA量较多时,在TE Buffer或灭菌水中不易完全溶解。此时可以使用8 mM NaOH来溶解基因组DNA。经8 mM NaOH溶解的基因组DNA溶液因pH值较高,可能会影响长期储存及后续PCR反应等实验,需再使用HEPES溶液来调节pH值。1 ml 8 mM的NaOH按下列比例添加HEPES溶液来调节pH值。

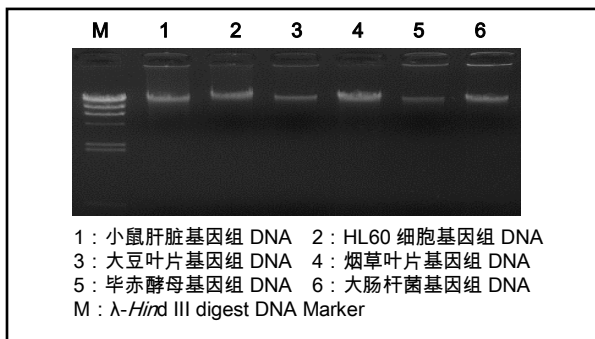
Final pH	1 M HEPES (μl)
7.0	32
7.2	23
7.5	15.9
7.8	11.7
8.0	10.1
8.2	9.3
8.4	8.6

【基因组DNA提取操作流程简图】



实验例

使用本试剂提取不同组织材料的基因组DNA,1% Agarose凝胶电泳结果如下。



Troubleshooting

1. 一般情况下组织或细胞中所能提取的DNA量如下表:

组织材料	起始样品量	基因组DNA提取量
肝脏	100 mg	300~400 μg
肾脏	100 mg	300~400 μg
脑	100 mg	200~300 μg
心脏	100 mg	200~300 μg
HL60培养细胞	1×10 ⁷ 个	50~70 μg
植物叶片	1 g	20~200 μg
<i>E.coli</i> Cells	1×10 ⁹ 个	30~40 μg

2. 有关DNA的吸光度说明如下:

260 nm、320 nm、230 nm、280 nm下的吸光度分别代表了核酸、背景(溶液浑浊度)、盐浓度和蛋白质等有机物的吸光度值。OD₂₆₀/OD₂₈₀(R)体现了DNA中的蛋白质等有机物的污染程度,质量较好的DNA的R值应在1.8~2.0之间,当R<1.8时,溶液中的蛋白质等有机物的污染比较明显;当R>2.2时,说明DNA已经被水解成了单核苷酸。在对核酸进行吸光度检测时,需要注意稀释液应使用TE Buffer。

3. 如何计算DNA的浓度?

DNA浓度 = (OD₂₆₀ - OD₃₂₀) × 稀释倍数 × 0.05 μg/μl。

4. 基因组DNA提取量较低怎么办?

- ① 向组织材料中加入DNAiso Reagent后,请充分研磨、匀浆,使其充分裂解。
- ② 组织材料中的DNA含量较少,提高起始材料使用量,本试剂不适用于微量组织材料DNA的提取。
- ③ 增加DNAiso Reagent的添加量。

5. 提取的基因组DNA不溶怎么办?

- ① 75%乙醇清洗沉淀后不要干燥时间过长或加热干燥。
- ② 基因组DNA在dH₂O或TE Buffer中不易完全溶解,可以换成8 mM NaOH溶解。
- ③ 当基因组DNA的量过大时不易溶解,可以加长溶解时间或轻轻摇动离心管以促进溶解。

6. OD₂₆₀/OD₂₈₀值<1.65,为什么?

- ① DNA应使用TE Buffer稀释后再进行吸光度值的测定,低离子强度或低pH值会使OD₂₈₀值升高。
- ② 样品裂解时加入的DNAiso Reagent量偏少,造成蛋白质变性不充分,可以再次对DNA溶液进行苯酚/氯仿抽提,以除去蛋白质。
- ③ 基因组DNA未充分溶解。

7. 提取的基因组DNA降解,为什么?

- ① 使用的组织材料不够新鲜。提取基因组DNA的组织材料应采用新鲜的组织材料,或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于-80°C保存。
- ② 操作剧烈造成基因组DNA断裂,破坏了基因组DNA的完整性。

8. 提取的基因组DNA中含有RNA污染,为什么?

- ① 组织材料或细胞裂解后未使用离心法除去RNA。
- ② 提取出的基因组DNA量较少时,采用离心法而未使用缠绕法收集基因组DNA沉淀,容易带来RNA污染。
- ③ 如果提取的基因组DNA中含有RNA时,可以对提取的基因组DNA进行一次LiCl沉淀,以除去RNA污染,或者使用RNase进行处理。