

Omega 基因组 DNA 提取系列

E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit

简介

E.Z.N.A Tissue DNA Kit 可以提供一种快速简单的基因组 DNA 的分离方法，分离得到的 DNA 可用于 PCR 和 Southern 分析。可以一次处理小于 30 mg 的组织或者小于 1 cm 小鼠尾巴片段。此方法也可以用于小鼠尾巴、血液、血清、黄层、血浆中提取 DNA。该试剂盒可以完成单个或多个样品的操作。该试剂盒不需要酚氯仿抽提，而且除去了耗时的操作如异丙醇沉淀或乙醇沉淀。经过 E.Z.N.A Tissue DNA Kit 提纯的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交和酶切等。

E.Z.N.A Tissue DNA Kit 应用了 HiBind 膜基质，一种新型的硅胶材料的可逆结合能力。该技术与离心柱技术结合提高了速度。在一种特定的盐溶液的作用下膜基质可以结合到最多 60kb 的基因组 DNA。样品先在使其变性的环境下裂解，然后加入到 HiBind 结合柱以结合 DNA，而其他细胞碎片和杂质有效地被洗涤掉。高分子量的 DNA 最后用预热的洗脱液进行洗脱。

储存和稳定性

E.Z.N.A Tissue DNA Kit，除了蛋白酶外的所有成分，储于 22℃-25℃，而且我们保证最少可以保存 24 个月。在蛋白酶在溶解后就应储存于-20 度。BL 在低温下可能会出现沉淀，加热到 37 度溶解沉淀。所有 E.Z.N.A Tissue DNA Kit 在购买后储存于 22-25℃可以保存至少 24 个月。

结合能力

每个 HiBind DNA 结合柱可以结合 100ug DNA，不推荐处理大于 30mg 组织样品或者 107 细胞样品样品。

试剂盒成分

Cat.No.	D3396-00	D3396-01	D3396-02
Purification Times	5 preps	50 preps	200 preps
HiBind DNA Mini Columns	5	50	200
2 ml Collection Tubes	15	150	600
Buffer TL	3 ml	20 ml	60 ml
Buffer BL	3 ml	20 ml	50 ml
Buffer HB	3 ml	30 ml	110 ml
DNA Wash Buffer Concentrate	2 ml	20 ml	3 x 20 ml
OB Protease	3 mg	30 mg	4 x 30 mg
说明书	1	1	1

准备工作:

- 请仔细阅读整个说明书以熟悉 E.Z.N.A Tissue DNA Kit 试剂盒的流程；
- DNA Wash Buffer 使用前必须按下列要求用无水乙醇进行稀释，并储存于室温：

D3396-00 加入 8 ml 无水乙醇（96%-100%）；

D3396-01 加入 80 ml 无水乙醇（96%-100%）于各瓶中；

D3396-02 加入 80 ml 无水乙醇（96%-100%）于各瓶中；

A) 组织基因组 DNA 提取

准备好以下试剂和仪器

- 微量离心机和灭菌 1.5 ml 离心管；
- 预热 Elution Buffer 到 70℃（每份样品要 0.5 ml）；
- 水浴摇床—预设到 55℃
- 无水乙醇-大约每份样品要 0.3 ml；
- RNase A(可选)—25 mg/ml 的储备液

以下方案可从最多 30mg 组织中提取基因组 DNA，产量取决于样品来源。

可选步骤：虽然使用机械匀浆器匀浆组织并非必要，但是用液氮研磨组织可以提高裂解效果和减少孵育时间。当液氮挥发完后，将粉末转移至 1.5 ml 的离心管中，加入 200μl Buffer TL，开始第二步操作：

1. 称取≤30 mg 的组织，加入到 1.5ml 的离心管中，加入 200μl buffer TL。将样品剪成一块块小块可以加速裂解效果。如果样品大于 30mg，可按比例提高 buffer TL 的用量，如样品为 60mg，则加入 400μl Buffer TL。
2. 加入 25μl OB 蛋白酶，涡旋混匀，于 55℃ 水浴摇床中振荡孵育至组织完全消化。如果没有水浴摇床，水浴时每隔 20-30min 混匀一次。消化时间取决于样品使用量和组织类型，一般 3 小时就能获得良好的裂解效果，样品也可裂解过夜。
3. OB 蛋白酶所用的体积需要根据样品的量进行调整，60mg 的组织样品用 50 μl。
4. 可选步骤：某些组织例如肝脏包含有高丰度的 RNA，它可能会和 DNA 一起回收出来，虽然 RNA 的污染并不会影响 PCR 操作，但可以在这个步骤将其去除。可加入 5μl（对于 30mg 的样品）RNaseA(25mg/ml)混匀，于室温下放置 2-5min，继续下面的操作；
5. 室温下，10,000×g 离心 5min 去除不溶解的杂质，小心将上清液转移到新的离心管中而留下不溶解的杂质。
6. 加入 220 μl Buffer BL，涡旋混匀。70℃ 处理 10min。加入 Buffer BL 后，可能会产生一些沉淀，但不会影响 DNA 的回收。根据样品的使用量调节 Buffer BL 的体积；
7. 加入 220μl 无水乙醇（室温，96-100%），最高速度涡旋以充分混匀。如果样品的用量超过 30mg，调节无水乙醇的用量；如果这时候看到沉淀，用枪头吹打 10 次以吹散沉淀。
8. 把 HiBind® DNA 结合柱套在 2ml 收集管中（已提供），将第 6 步得到的所有溶解液转入柱子中（包括所有的沉淀物），8,000×g 离心 1min 以结合 DNA，弃去滤过液和收集管。
9. 可选步骤：如果样品多于 30mg，就按照上面的步骤把剩下的裂解液转入柱子，确保所有的溶液都通过柱子。
10. 将 HiBind® DNA 结合柱套在新的 2ml 收集管，加入 500 μl HB Buffer 至柱子中，8,000×g 离心 1min，弃去滤过液和收集管；
11. 将 HiBind® DNA 柱子套在新的 2ml 收集管中，再加入 700 μl DNA Wash Buffer 至柱子中，8,000×g 离心 1min，弃去滤过液；
12. 注意：所提供的 DNA Wash Buffer 是浓缩液，须按照瓶上的说明用酒精进行稀释，或参照“实验前的准备”。如果 DNA Wash Buffer 冰冻过了，使用前须在室温下解冻。
13. 把柱子套回第 10 步的 2ml 离心管，再加入 700μl DNA Wash Buffer 至柱子中，按第 10 步方式离心。
14. 将 HiBind® DNA 柱子重新套回 2ml 收集管中，12,000×g 以上离心空柱 2min 以干燥柱子的基质；这一步对下面的洗脱步骤至关重要。
15. 将柱子置于 1.5ml 灭菌离心管，加入 100-200 μl 70℃ 预热的 DNA Elution Buffer 至柱子的膜

中央。室温静置 3min；

16. 室温下，10000×g 离心 1min，以洗脱 DNA。重复用另 100-200 μl 的预热的 DNA Elution Buffer 离心洗脱，弃去柱子。
17. 注意：每次洗脱可得到 60%~70% 结合于柱上的 DNA，因此两次洗脱的总量一般可大于 90%。然而，增加洗脱体积会减少最终产物的浓度。若想得到高浓度的 DNA，可使用 50 μl~100 μl 的 DNA Elution Buffer 来洗脱（产量将略微下降）。洗脱体积低于 50 μl 将大大减少产量。在某些情况下，加入 Elution buffer 后可以在 70 度温育柱子以提高产量。可以通过另外可使用第一次洗脱液进行第二次洗脱。
18. 若有需要，可浓缩 DNA。加入终浓度为 0.1M 的 NaCl 和 2 倍体积的无水乙醇。混匀完全后于 -20℃ 放置 10min，10,000×g 离心 15min，弃去上清液。加入 700 μl 的 80% 乙醇后，以 10,000×g 离心 2min，弃去上清，在空气中干燥沉淀并用 20 μl 的灭菌双蒸水或 10mM Tris-HCl (PH8.0) 重悬 DNA。

B) 从培养细胞中提取基因组 DNA

准备好以下试剂和仪器：

- 微量离心机和灭菌 1.5 ml 离心管；
- 预热 Elution Buffer 到 70℃（每份样品要 0.5 ml）；
- 水浴摇床—预设到 55℃
- 无水乙醇-大约每份样品要 0.3 ml；
- RNase A(可选)—25 mg/ml 的储备液

该方案适合于从 5×10⁶ 个细胞中纯化 25ug 的基因组 DNA。

1. 准备细胞重悬液
 - 1 a: 冰冻的细胞样品必须在开始之前进行解冻。离心收集细胞，用 PBS 洗涤一次，用 200μl 预冷的 PBS 重悬细胞，按第二步进行操作；
 - 1 b: 如果细胞悬浮生长，1200×g 离心收集 5×10⁶ 个细胞，去除培养基，用 PBS 洗涤一次，加入 200μl 预冷的 PBS 重悬细胞；
 - 1 c: 如果细胞贴壁生长，用胰蛋白酶消化后，收集细胞，洗涤两次，最后用 200μl 预冷的 PBS 重悬；
2. 加入 25μl OB 蛋白酶（20mg/ml），混匀。于 65℃ 水浴于处理 5min，让细胞完全裂解。
3. 可选步骤：某些培养细胞包含有高丰度的 RNA，它可能会和 DNA 一起回收出来，一般情况下，RNA 的污染并不会影响 PCR 操作，但可以在这步将其去除。因此，可加入 5μl（用于 5×10⁶ 个细胞）RNaseA(25mg/ml)混匀，于室温下放置 2-5min，继续下面的操作；
4. 加入 220μl Buffer BL，涡旋混匀（室温，96-100%）；于 70℃ 处理 10min。加入 Buffer BL 后，可能会产生一些纤维状沉淀，但不会影响 DNA 的回收。根据样品的使用量调节 Buffer BL 的体积；
5. 加入 220μl 无水乙醇，涡旋混匀。根据样品的用量，调节无水乙醇的用量；如果这时候看

到沉淀，可用枪头吹打 10 次打散沉淀。

6. 下面的操作请参照第组织 DNA 提取方案的 7-14 步。

C) 从老鼠尾巴中提取基因组 DNA

准备好以下试剂和仪器：

- 微量离心机和灭菌 1.5 ml 离心管；
- 预热 Elution Buffer 到 70℃（每份样品要 0.5 ml）；
- 每个样品需要用 200 μl 的 BL Buffer 和 200 μl 的无水乙醇的混合液，此混合液可以预先准备，室温储存，但不要储存超过一个月。
- 水浴摇床—预设到 55℃
- 无水乙醇-大约每份样品要 0.3 ml；
- RNase A(可选)—25 mg/ml 的储备液。

注：把已冻藏的样品和 OB 蛋白酶溶液放到室温下，70℃预热 Elution Buffer(每个样品要 0.5ml)。

1. 剪碎长度为 0.2-0.5cm 的老鼠尾巴放置于 1.5ml 的离心管中，加入 180 μl Buffer BL。如果有必要的话，可灼烧伤口以防止流血。可适当地在动物耳朵上做标记，放到干净笼子里。
注：老鼠年龄不能超过 6 个星期，因为超过 6 个星期后，老鼠尾巴将很难裂解而很难得到理想的回收产物。如可能的话，可在小鼠 2-4 个星期时，切出小鼠尾巴，然后保存于-70℃。

加入 25μl OB 蛋白酶，涡旋混匀，于 55℃水浴摇床孵育 1-4 小时或至充分裂解。如果没有水浴摇床，可每隔 20-30min 涡旋混匀一次。不充分的裂解会导致柱子阻塞而降低 DNA 产量。样品的消化时间取决于小鼠尾巴的使用量和老鼠的年龄。2 龄 0.5cm 小鼠尾巴一般只需要 2 小时就能获得良好的效果。对于年龄老的小鼠可消化过夜。注：骨和毛是不能消化的。

2. 室温下，10,000×g 离心 5min 沉淀去除不溶解的杂质和毛发。小心转移上清液至新的离心管中，在吸取上清液时，不要吸到任何沉淀物。

可选步骤：小鼠尾巴中的 RNA 可能会和 DNA 一起纯化出来。一般情况下，RNA 的污染不会影响到 PCR 反应，但可能会影响其它酶促反应。如需去除 RNA，可加入 15μl RNaseA(25mg/ml) 混匀，于室温孵育 2min。

3. 加入 1 倍体积的 Buffer BL 和一倍体积的乙醇，或者可以加入 2 倍体积的 BL/乙醇混合物到样品，最高速度涡旋 15 秒混匀。涡旋混匀是必需的。如果这时候看到沉淀，可通过颠倒混匀沉淀。

4. 下面的操作请参照“组织 DNA 提取方案”的 7-14 步。

D) 从石蜡包埋的组织中提取基因组 DNA

1. 剪称不超过 30 毫克的组织（~2mm³）于 2ml 离心管中；
2. 加入 1ml 二甲苯，充分涡旋混匀以去除石蜡；
3. 室温下，10,000×g 离心 10min；吸取上清液，不要碰到组织沉淀；
4. 加入 1ml 无水乙醇洗涤去除二甲苯，室温下，10,000×g 离心 5min；弃去上清液，不要倒

出组织沉淀；

5. 重复用无水乙醇洗涤；
6. 37℃，空气处理 15min；
7. 加入 200μl Buffer TL 至组织中，然后按“组织 DNA 提取方案”的 2 步起开始往下操作；

注：组织中含有多聚甲醛，会导致 RNA 或 DNA 降解，降解的程度取决于固定剂的类型，但是得到的 DNA 通常都小于 500bp。降解的原因跟 E.Z.N.A.组织 DNA 提取方案无关，而 PCR 检测 500bp 以下片断可以得到良好的结果。

E) 组织基因组 DNA 提取—真空/离心方案

像前面提到的方案那样，完成样品的裂解，匀浆，蛋白酶消化，和上 DNA 结合柱。按照下面的步骤来代替了连续的离心操作。

注：在使用此方案前，请先通读本说明书前面的章节。

1. 按照使用说明准备好真空抽滤盒，然后把 V-Spin DNA 结合柱连接到真空抽滤盒上。
2. 把样品转入 V-Spin DNA 结合柱。
3. 打开抽滤装置，让样品通过结合柱，然后关掉抽滤装置。
4. 加入 500μl HB Buffer 洗涤柱子，打开真空抽滤装置，让溶液通过柱子。
5. 加入 700μl DNA Wash Buffer 通过抽滤洗涤柱子。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 把柱子套上 2ml 的收集管，最高速度离心，（不高 20000g）2min，甩干柱子。
8. 把柱子套上干净的 1.5ml 离心管，加入 100-200 μl DNA Elution Buffer，静置 1-2min，离心 1min，洗脱 DNA。

产量与质量的测定

DNA 的产量可由分光光度计检测，用去离子水、Tris-HCl 或 DNA Elution Buffer 作空白对照。提取的产品保存在-20℃以防止降解。

DNA 浓度可按以下公式计算：

$$[DNA] = (A_{260}) \times (0.05 \mu g/\mu l) \times \text{稀释倍数}$$

DNA 的分子量可通过比较在 260nm 和 280nm 处的吸光度估计得到。A₂₆₀/A₂₈₀ 的比率在 1.7~1.9 就相当于 85%~95%的纯度。

期望的 DNA 产量随组织的数量与各类而变化，30mg 的新鲜组织通过两次洗脱（每次 200 μl）可得到 10-40ug DNA。

常见问题及对策

出现的问题	可能的原因	建议
堵柱子	裂解不充分	加入足够量的 BL, 并在 70 度孵育足够的时间, 有时需要延长孵育时间 10min。
	样品量过大	如果样品量大于 30mg, 需要调整蛋白酶, BL, 及乙醇的体积, 然后将裂解液连续过柱
	样品太粘稠	将样品分成多个样品, 分别加入 Elution buffer , 用 Tris-HCl 稀释到 250μl
产量低	堵柱子	见上
A260/A280 偏低	洗脱差	重复洗脱或加大洗脱体积, 将洗脱液 70 度预热 5min, 可以增加产量
	洗涤不当	DNA wash buffer 须用无水乙醇进行稀释 (“实验前的准备”)
	洗脱步骤过分离心	可能柱子膜上的树脂掉落到洗脱液中, 故不要用给定的离心速度以上的速度离心, 以防树脂脱落, 但这不会影响 PCR 及酶切。