

Version: AA 3.2 (2021.04.01修订)

SPARKclassic Tissue/Cell DNA Kit

中量/大量组织/细胞基因组DNA提取试剂盒

(溶液型)

目录号: AA1004

01/产品组分

序号	组分	20 次	50 次
		AA1004-A	AA1004-B
1	细胞核裂解液	180 mL	450 mL
2	蛋白沉淀液	60 mL	150 mL
3	DNA 溶解液	10 mL	20 mL
4	RNase A (10 mg/mL)	360 µL	900 µL

02/保存条件

RNase A于-20℃保存，其它组分室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

本试剂盒用于动植物细胞/组织基因组 DNA 的快速提取，可在 1 h 内完成单个或多个样本的提取工作。样品研磨或者匀浆后加入细胞核裂解液，首先在强去污剂和蛋白酶 K 协同作用下裂解细胞释放出基因组 DNA，加入 RNase A 去除 RNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重新溶解于 DNA 溶解液。

04/自备材料

异丙醇、70%乙醇、PBS 和胰蛋白酶（用于细胞）、蛋白酶 K（20 mg/mL）（用于大量组织）

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热备用。
- ◇ 环境温度低时细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- ◇ 蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 水浴帮助重新溶解，如果不能完全溶解，也不影响使用效果，直接取用上层溶液即可。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。

06/使用方案

1. 样本处理

u 组织培养细胞

- a. 收集 $6-8 \times 10^7$ 个细胞到一个50 mL离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. $500 \times g$ 离心5 min，使细胞沉淀下来，弃上清，留下细胞团和大约100 μ L残留的液体。
- c. 加3 mL PBS重悬洗涤细胞，重复上一步骤，高速涡旋振荡重悬细胞团。
- d. 对于细胞核裂解液裂解效果不好的细胞系（例如PC12细胞），在做下一步骤前，应该做几次冻融循环：冻于液氮后，在95℃水浴融化，重复4次。
- e. 加入9 mL细胞核裂解液，用大口径的枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打裂解细胞直至看不见细胞团块（如有必要可以37℃温育帮助裂解）。
- f. 接操作步骤项下2。

u 动物组织（例如鼠肝脑）

- a. 9 mL冰预冷的细胞核裂解液加入300 mg新鲜或者解冻的组织，匀浆器匀浆完全，将裂解物转入50 mL离心管。另一种方法：在液氮中研磨300 mg组织成细粉后，转入装有9 mL冰预冷细胞核裂解液的50 mL离心管，用大口径枪头吹打混匀。
- b. 将裂解物放置在65℃水浴15-60 min。
 - ▲如果需要最大的产量，可加入45 μ L蛋白酶K（20 mg/mL），颠倒25次混匀，55℃水浴3 h或者过夜。直到组织溶解，中间不时颠倒混匀。
- c. 接操作步骤项下2。

u 植物组织

- a. 在液氮中研磨约400 mg新鲜植物组织或约200 mg干植物组织成细粉后，转入装有9 mL冰预冷的细胞核裂解液的50 mL离心管，用

大口径枪头吹打混匀。

▲植物组织起始处理量应该根据叶龄、种类、基因组大小调整。

b. 将裂解物放置在65°C水浴15-60 min，期间至少颠倒10次。

c. 接操作步骤项下2。

2. 加入18 μL RNase A (10 mg/mL) 至裂解物中，即RNase A终浓度30 μg/mL，颠倒混匀25次后，37°C温育15-60 min去除残留RNA。

然后室温冷却至少5 min或者冰浴使恢复到室温。

3. 在恢复到室温的裂解物内加入3 mL蛋白沉淀液，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀25 s。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。冰浴5 min。

▲由于样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组DNA。

4. 2,500×g (可根据需要调整加大离心力) 离心10 min。这时应该可以见到管底蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。

5. 小心取上清到一个新的50 mL离心管中，不要吸到沉淀。

▲吸取上清时，注意不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心2 min后取上清。

6. 加入等体积的室温异丙醇 (约9 mL)，颠倒30次混匀或者直到出现棉絮状 (丝状) 白色DNA沉淀。

▲注意：颠倒混匀的时候，棉絮状 (丝状) DNA有时会粘附着在盖子或者管口处，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到DNA。解决办法是略去步骤7，直接2,000×g离心3-5 min，弃上清，然后接步骤9。

7. 垂直放置离心管，让白色DNA沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃上清，注意不要吸到沉淀。

▲如果棉絮状 (丝状) DNA沉淀附着有气泡，则会漂浮在液体表面，而不会沉淀下来，要小心避开沉淀吸取上清，不要把沉淀给吸掉了。

8. 加入9 mL 70%乙醇后，颠倒几次漂洗DNA沉淀，2,000×g离心3-5 min，在管底可以见到白色的DNA沉淀块，弃上清。

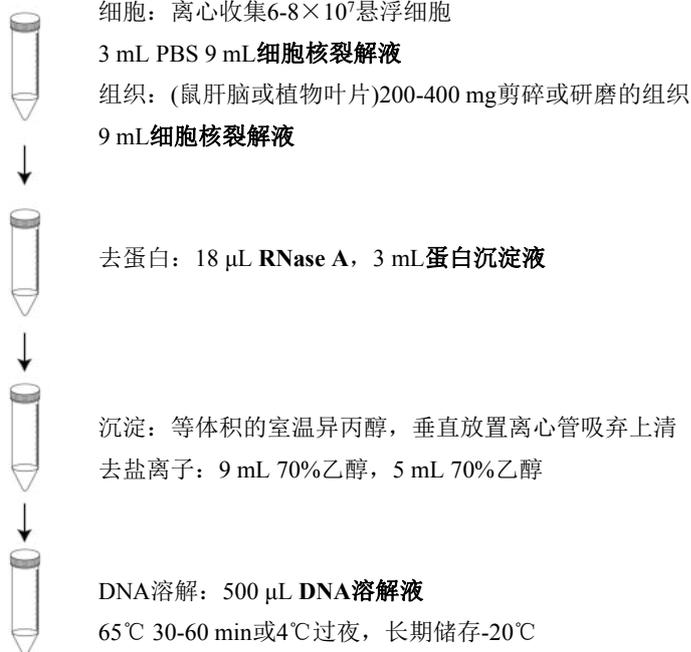
9. 加入5 mL 70%乙醇，颠倒几次漂洗DNA沉淀，2,000×g离心1 min，弃上清，倒置在吸水纸上控干或用枪头吸掉残留乙醇，空气晾干沉淀几分钟。

▲注意不要干燥过头，否则DNA极其难溶；也不能残留太多乙醇，否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

10. 加入500 μL DNA溶解液重新水化溶解DNA沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在65°C温育30-60 min (不要超过1 h)，也可以在室温或者4°C放置过夜来重新水化DNA，中间不时的轻弹管壁帮助重新水化DNA。

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

07/流程简图



08/相关产品

- AA1906 蛋白酶K (10 mg/mL)
- AA0901 SPARKeasy 全血/组织/细胞基因组DNA快速提取试剂盒
- AA1001 SPARKeasy 组织/细胞基因组DNA快速提取试剂盒
- AC0101 SparkZol Reagent
- AC0202 SPARKeasy 组织细胞RNA快速提取试剂盒 (含基因组DNA清除柱)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

