

Onestep-Lysis[®] Blood & Tissue & Cell Genomic DNA Isolation Kit
一步法血液/组织/细胞基因组 DNA 抽提试剂盒

目录号：DNE24

试剂盒组成

试剂盒组成	保存	DNE24-01 (50 次)	DNE24-02 (100 次)	DNE24-03 (200 次)
Buffer LB*	室温	30 ml	60 ml	120 ml
Buffer WB1	室温	25 ml	50 ml	100 ml
Buffer WB2	室温	13 ml	25 ml	25 ml×2
		第一次使用前按说明加指定量无水乙醇		
Buffer TE	室温	10 ml	20 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	4°C	1 ml	1 ml×2	1 ml×4
Onestep-Lysis [®] Columns AC	室温	50 个	100 个	200 个
Collection Tubes	室温	50 个	100 个	200 个
Manual		1 份		

*Buffer LB 中添加有 Proteinase K 替代成分，使用时无需额外添加 Proteinase K。运输与保存更方便。

保存方法

RNase A 溶液 4°C 保存，-20°C 可长期保存（两年）；其他组分室温保存 12 个月内效果稳定。



本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒是用于提取动物组织、培养细胞、血液等基因组 DNA 的一步法提取试剂盒。试剂盒采用特殊的细胞裂解系统，由细胞裂解液快速溶解核膜，释放 DNA，并使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，纯化过程无需苯酚/氯仿等有机试剂。纯化得到的 DNA 可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

标准抽提步骤

- 所有离心步骤均可在室温完成，使用普通台式离心机即可。
- 开始试验前请将需要的水浴或金属浴预热至 65°C 备用。
- 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

1. 组织或细胞的裂解：

动物组织的裂解

- a) 取 5-25 mg 组织（脾脏组织用量应少于 10 mg）用液氮（或组织研磨器）研磨粉碎，转移至 1.5 ml 离心管中。
- b) 向离心管中加入 600 μ l Buffer LB，用移液器反复吸打或剧烈涡旋振荡混匀，65°C 孵育 10-30 min，其间涡旋混匀数次帮助组织裂解。裂解完成后加入 20 μ l RNase A (10 mg/ml) 溶液，室温放置 5 min 消化去除 RNA。
- c) 12,000 rpm (~13400 \times g) 离心 5 min，沉淀不能裂解的组织碎片，吸取上清至新的离心管中，进行步骤 2。

培养细胞的裂解

- a) **贴壁细胞**：先用胰蛋白酶将贴壁细胞处理成细胞悬液，转移至 1.5 ml 离心管中，12,000 rpm 离心 30 s，吸弃上清，留下细胞团。
悬浮细胞/革兰氏阴性菌：收集约 10^5 - 10^6 个悬浮细胞或 10^6 - 10^8 个细菌细胞至 1.5 ml 离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，留下细胞团。
- b) 向离心管中加入 400 μ l Buffer LB 和 20 μ l RNase A (10 mg/ml)，用移液器反复吸打或涡旋振荡至彻底悬浮，室温放置 10 min，进行步骤 2。

全血的裂解

- a) **无核红细胞抗凝血（哺乳类动物）**：当血液体积 < 200 μ l 时，直接加入 Buffer LB 补足至 400 μ l；当体积为 200-1000 μ l 时，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 1 min，弃掉上层血清，向血细胞沉淀中加入 400 μ l Buffer LB，用移液器反复吸打或涡旋振荡混匀（注意将血丝全部混匀溶解），65°C 孵育 10 min，进行步骤 2。
-

- b) **有核红细胞抗凝血(禽类、鸟类、两栖类等)**: 取 5-10 μl 抗凝血, 加入 400 μl Buffer LB, 用移液器反复吸打或涡旋振荡混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 进行步骤 2。
 - c) **哺乳动物凝血块**: 取 0.1 g 凝固血块放入 1.5 ml 离心管中, 用吸头尽量捣碎(或液氮研磨), 加入 400 μl Buffer LB, 充分吸打或涡旋振荡混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 进行步骤 2。
2. 向裂解上清液中加入 0.5 倍体积的异丙醇, 充分吸打混匀, 可能会出现絮状沉淀, 不影响后续操作。
 3. 将上一步所得溶液和可能出现的絮状沉淀加入到 Onestep-Lysis[®] Columns AC 中(吸附柱 AC 放入收集管中), 若一次不能加完可分两次, 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。
 4. 向吸附柱 AC 中加入 500 μl 去蛋白液 Buffer WB1, 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。
 5. 向吸附柱 AC 中加入 600 μl Buffer WB2 (使用前请检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。
 6. 重复步骤 5。
 7. 将吸附柱 AC 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 尽量除去残留的 WB2, 弃掉收集管和废液。
 - 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会降低洗脱效率, 影响后续的酶促反应(酶切、PCR 等)。
 8. 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μl Buffer TE 或灭菌水, 室温放置 3-5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 DNA。
 - Buffer TE 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 中预热可以增加产量, DNA 产量较高时可加入 TE 后的吸附柱短暂置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 以使 TE 全部吸附在滤膜上充分溶解 DNA。也可用无菌水洗脱, 但应确保其 PH 在 7.0-8.5 范围内。
 - 如果要提高 DNA 的终浓度, 可以使用小于 100 μl TE 洗脱, 也可以将步骤 8 所得的 DNA 溶液重新加至吸附膜上, 再次离心洗脱。如果预期 DNA 的量小于 1 μg , 推荐用 50 μl Buffer TE 进行洗脱。
