

产品目录号：
A1120
A1123
A1125
A1620

Wizard[®]基因组 DNA 纯化试剂盒

简明操作步骤



注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.html> 本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

内容

I.	试剂盒组成和储存条件.....	第 1、2 页
II.	从全血（300ul 或 3ml）中提取基因组 DNA.....	第 2 页
III.	从全血（10ml）中提取基因组 DNA.....	第 3 页
IV.	从全血（96 孔板）中提取基因组 DNA.....	第 4 页
V.	从培养细胞和动物组织中提取基因组 DNA.....	第 6 页
VI.	从植物组织中提取基因组 DNA.....	第 8 页
VII.	从酵母中提取基因组 DNA.....	第 8 页
VIII.	从革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌中提取基因组 DNA.....	第 9 页
IX.	试剂配方.....	第 10 页
X.	表 1.不同起始材料的 DNA 产量.....	第 10 页

I. 试剂盒组成和储存条件			产品	包装	目录号
			Wizard [®] Genomic DNA Purification Kit	500 次	A1125
			Wizard [®] Genomic DNA Purification Kit	100 次	A1120
仅供实验室使用。每个试剂盒包含的试剂，足够进行 100 次从 300ul 全血中提取基因组 DNA 的实验：			仅供实验室使用。每个试剂盒包含的试剂，足够进行 500 次从 300ul 全血中提取基因组 DNA 的实验：		
● 100ml	Cell Lysis Solution		● 500ml	Cell Lysis Solution	
● 50ml	Nuclei Lysis Solution		● 250ml	Nuclei Lysis Solution	
● 25ml	Protein Precipitation Solution		● 125ml	Protein Precipitation Solution	
● 50ml	DNA Rehydration Solution		● 100ml	DNA Rehydration Solution	
● 250ul	RNase Solution		● 1.25ml	RNase Solution	

Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤



产品	包装	目录号
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	100 次	A1620

仅供实验室使用。每个试剂盒包含的试剂，足够进行 100 次从 10ml 全血中提取基因组 DNA 的实验：

- 3L Cell Lysis Solution
- 1L Nuclei Lysis Solution
- 350ml Protein Precipitation Solution
- 150ml DNA Rehydration Solution

注意：目录号 A1620 不含 RNase Solution。

储存条件：室温（22-25°C）存放。有效期见产品标签。

II. 从全血（300ul 或 3ml）中提取基因组 DNA 的操作步骤

经我们测试，从 EDTA、肝素及柠檬酸抗凝管保存的新鲜全血中提取的基因组 DNA 对于随后的 DNA 操作，包括 PCR，没有任何不利影响。抗凝血样本可在 2-8°C 保存至多 2 个月，但保存时间越长，DNA 产量会下降越多。

以下部分是经过验证的从至多 3ml 血样中提取 DNA 的操作方法。基因组 DNA 的产量取决于白细胞的数量。冷冻血样也可使用该操作方法，但产量会低于新鲜血样，而且需更多的细胞裂解液处理。

警示：操作血样时，请遵从贵单位对生物危险品的操作规则。

请使用者准备：

- 无菌 1.5ml 小离心管（300ul 血样）
- 无菌 15ml 离心管（3ml 血样）

普洛麦格(北京)生物技术有限公司 电话: 800 810 8133, 010 58256268 网址: www.promega.com; www.promega.com.cn

CTM050 修改于 8/14

第 2 页

- 37°C 水浴
- 异丙醇，室温
- 70% 乙醇，室温
- 65°C 水浴（非必须，用于快速溶解 DNA）

1. **300ul 样品：**取无菌 1.5ml 小离心管一只，加入 900ul 细胞裂解液。

3ml 样品：取无菌 15ml 离心管一只，加入 9.0ml 细胞裂解液。

⚠重要：血液样品必须使用 EDTA、肝素或柠檬酸抗凝管收集以防血凝。

2. 轻轻振荡血样试管，直到彻底混匀；然后将血样转移至上述加有细胞裂解液的离心管中。颠倒离心管 5-6 次混匀。

3. 室温孵育 10 分钟（期间颠倒离心管 2-3 次混匀，一次）裂解红细胞。对于 300ul 血样，13,000-16,000 x g 室温离心 20 秒。

对于 3ml 血样，2,000 x g 室温离心 10 分钟。

4. 尽可能将上清移弃干净，勿搅动白色沉淀。1.5ml 离心管（300ul 血样）里会剩余约 10-20ul 液体，15ml 离心管（3ml 血样）里会剩余约 50-100ul 液体。

若是冷冻血样，重复 1-4 步操作直到沉淀变白。从冷冻血样提取 DNA 可能会损失产量。

注意：红细胞和细胞碎片可能会与白细胞混杂一起。如果沉淀看起来只有红细胞，移弃上清后，加入额外的细胞裂解液，重复 3-4 步操作。

5. 使用涡旋振荡器（Vortex）剧烈混匀，直至白细胞重悬（10-15 秒）。

⚠彻底重悬才能有效裂解白细胞。



Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤

6. 向重悬细胞溶液中加入核裂解液（300ul 血样的加 300ul, 3ml 血样的加 3.0ml）。用移液枪头吸放溶液 5-6 次裂解白细胞。此时溶液应变得很粘稠。若混合后可见细胞团块，则将溶液置于 37°C 孵育直至团块消散。若孵育 1 小时后仍可见细胞团块，则另加核裂解液（300ul 血样的加 100ul; 3ml 血样的加 1.0ml）并重复 37°C 孵育。

7. **非必须：**向核裂解物中加入 RNA 酶溶液（300ul 血样的加 1.5ul; 3ml 血样的加 15ul）并颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15 分钟，继而冷却至室温。

8. 向核裂解物中加入蛋白沉淀液（300ul 血样的加 100ul; 3ml 血样的加 1.0ml; 见下列注释），用涡旋振荡器剧烈振荡 10-20 秒。可能有蛋白小团块出现。

注释：若在步骤 6 中另加了核裂解液，那么 300ul 血样的应加 130ul 蛋白沉淀液; 3ml 血样的应加 1.3ml 蛋白沉淀液。

9. 300ul 血样的于 13,000-16,000 x g 室温离心 3 分钟; 3ml 血样的于 2,000 x g 室温离心 10 分钟。

此时，应可见深棕色蛋白沉淀。若无沉淀，可能是①蛋白沉淀液加入之前样品没有冷至室温或②第 8 步没有混合均匀。

10. 300ul 血样：将其上清转至干净的装有 300ul 室温异丙醇的 1.5ml 离心管中。

3ml 血样：将其上清转至干净的装有 3ml 室温异丙醇的 15ml 离心管中。

注释：为避免 DNA 被蛋白污染，保留少许上清，勿吸取得过于彻底。

11. 轻轻颠倒以混匀溶液，直至白色线状 DNA 形成沉淀。

12. 300ul 血样的于 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟; 3ml 血样的于 2,000 x g 室温离心 1 分钟。可见白色小块状 DNA 沉淀。

13. 弃去上清，加入与样本量等体积的室温 70%乙醇，轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀和管壁，依照 12 步离心。

14. 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液。此时的 DNA 沉淀十分松弛，因此需格外小心避免将 DNA 沉淀吸进管中。将离心管倒置在干净的吸水纸上，自然干燥 10-15 分钟。

15. 向离心管中加入 DNA 溶解液（DNA Rehydration Solution）（300ul 血样的加 100ul; 3ml 血样的加 250ul），65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可以室温或 4°C 孵育过夜。

16. 2-8°C 保存 DNA。

III. 从全血（10ml）中提取基因组 DNA

经我们测试，从 EDTA、肝素及柠檬酸抗凝管保存的新鲜全血中提取的基因组 DNA 对于随后的 DNA 操作，包括 PCR，没有任何不利影响。抗凝血样本可在 2-8°C 保存至多 2 个月，但保存时间越长，DNA 产量会下降越多。

冷冻血样也可使用该操作方法，但产量会低于新鲜血样，而且需更多的细胞裂解液处理。

大规模提取基因组 DNA 试剂盒（目录号 A1620）可处理多至 1 升的全血样品。该试剂盒不含 RNA 酶溶液，因为 RNA 酶消化是非必须步骤。可单独购买 RNA 酶 A 溶液（4mg/ml，目录号 A7973）。若有必要，处理 1 升全血需要 5ml RNA 酶 A 溶液。

请使用者准备：

- 无菌 50ml 离心管
- 37°C 水浴
- 异丙醇，室温
- 70%乙醇，室温
- 65°C 水浴（非必须，用于快速溶解 DNA）

1. **10ml 全血样品:** 向无菌 50ml 离心管内加入 30ml 细胞裂解液。

! **重要:** 血样样品必须使用 EDTA、肝素或柠檬酸的抗凝管收集, 以防血凝。

2. 轻轻振荡血样试管, 将血样彻底混匀; 然后将 10ml 血样转移至上述含有细胞裂解液的离心管中。颠倒离心管 5-6 次混匀。

3. 室温孵育 10 分钟 (期间颠倒离心管 2-3 次混匀, 一次) 裂解红细胞。2,000 x g 室温离心 10 分钟。

4. 尽可能将上清移弃干净, 勿搅动白色沉淀。离心管里会剩余大约 1.4ml 液体。

若是冷冻过的血样, 另加 30ml 细胞裂解液, 颠倒 5-6 次混匀, 重复 3-4 步骤直到沉淀接近白色。从冷冻血样提取 DNA 可能会损失产量。

注释: 红细胞和细胞碎片会与白细胞混杂在一起。如果沉淀看起来只是红细胞, 移弃上清后, 再加入额外的细胞裂解液, 重复 3-4 步操作。

5. 使用涡旋振荡器剧烈振荡混匀, 直至白细胞重悬 (10-15 秒)。

! **彻底重悬才能有效裂解白细胞。**

6. 向重悬细胞溶液中加入 10ml 核裂解液。用移液枪头吸放溶液 5-6 次裂解白细胞。此时溶液变得很粘稠。若混合后可见细胞团块, 则将溶液置于 37°C 孵育直至团块消散。若孵育 1 小时后仍可见细胞团块, 则另加 3ml 核裂解液并重复 37°C 孵育。

7. **非必须:** 向核裂解物中加入 RNA 酶 A 溶液至终浓度 20ug/ml 并颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15 分钟, 继而冷却至室温。

8. 向核裂解物中加入蛋白沉淀液 3.3ml (见注释), 使用涡旋振荡器剧烈振荡 10-20 秒。可能有蛋白小团块出现。

注释: 若在步骤 6 中另加了核裂解液, 那么应加入 4ml 蛋白沉淀液 (而不是 3.3ml)。

9. 2,000 x g 室温离心 10 分钟。

此时, 应可见深棕色蛋白沉淀。若无沉淀, 可能是①蛋白沉淀液加入之前样品没有冷至室温或②第 8 步没有混合均匀。

10. 将上清转至另一 50ml 离心管, 此离心管已装有 10ml 室温异丙醇。

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 在含蛋白沉淀的离心管内保留少许上清, 勿吸取得过于彻底。

11. 轻轻颠倒以混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。

12. 2,000 x g 室温离心 1 分钟。可见白色小块状 DNA 沉淀。

13. 弃去上清, 向 DNA 中加入 10ml 室温 70% 乙醇, 轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀和管壁。依照 12 步离心。

14. 小心吸走乙醇溶液。此时的 DNA 沉淀十分松弛, 因此需格外小心避免将 DNA 沉淀吸进移液枪。自然干燥 10-15 分钟。

15. 向离心管中加入 800ul 的 DNA Rehydration Solution, 65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可以室温或 4°C 孵育过夜。

16. 2-8°C 保存 DNA。

IV. 从全血中 (96 孔板) 提取基因组 DNA

以下操作步骤适合 20ul、30ul 或 40ul 全血。表 2 列出了不同样本量每一处理步骤中使用的溶液体积量。一般 50ul 全血的基因组 DNA 产量在 0.2-0.7ug, 与血样中的白细胞数目有关。



Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤

表 2. 不同起始全血样本量与所需试剂量

全血	细胞裂解液 (红细胞裂解)	核裂解液	蛋白沉淀液	异丙醇	DNA Rehydration Solution
20ul	60ul	20ul	6.7ul	20ul	10ul
30ul	90ul	30ul	10ul	30ul	15ul
40ul	120ul	40ul	13.3ul	40ul	20ul
50ul	150ul	50ul	16.5ul	50ul	25ul

请使用者准备:

- V 底 96 孔板, 每孔可容纳 300ul 体积 (Costar® Cat.#3896)
- 异丙醇, 室温
- 70% 乙醇, 室温
- 96 孔板 sealer (Costar® Cat.#3095) (非必须, 用于处理人血样)

1. 向每孔中加入 150ul 细胞裂解液。

! **重要:** 血样样品必须使用 EDTA、肝素或柠檬酸的抗凝管收集以防血凝。

2. 向每孔加入 50ul 新鲜血样, 用加样枪反复吸放 2-3 次混匀。

3. 将平板在室温孵育 10 分钟, 期间用枪吸放溶液 2-3 次促进红细胞裂解。

4. 用台式离心机室温 800 x g 离心 5 分钟沉淀细胞。

5. 用加样枪头小心的尽可能将上清移弃, 留下白细胞和一些红细胞沉淀。推荐使用加长的加样枪头, 如凝胶加样枪头。将 96 孔板倾斜 50-80° (视每孔液体量而定) 将液体彻底移弃干净。

6. 向每孔中加入 50ul 核裂解液。反复吸放 5-6 次重悬细胞沉淀并裂解白细胞。此时溶液变得粘稠。为促进 DNA 形成可见沉淀, 可在这步向每孔加入 2ul Carrier

(例如, 聚丙烯 Carrier [Molecular Research Center, Inc., Cat.#PC152]), 通常 DNA 的产量不受 carrier 使用与否的影响。

7. 向每孔加入蛋白沉淀液 16.5ul, 反复吸放 5-6 次混匀。

8. 1,400 x g 室温离心 10 分钟。可见深棕色蛋白沉淀。若无沉淀, 可能是①蛋白沉淀液加入之前样品没有冷至室温或②第 8 步没有混合均匀。

9. 在 96 孔板中沉淀/溶解 DNA:

1) 取一块干净的 96 孔板, 向每孔中加入 50 ul 室温异丙醇, 小心的将第 8 步的上清逐孔转至这块板中, 反复吸放混匀。

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 在含蛋白沉淀的孔中保留少许上清, 勿吸取得过于彻底。仿照步骤 5, 倾斜平板有助于液体吸取。在这步使用加长的加样枪头不易于样本与异丙醇混匀。

2) 1,400 x g 离心 10 分钟。用加样枪头小心移弃异丙醇。

3) 向每孔加入 100ul 室温 70% 乙醇。

4) 1,400 x g 室温离心 10 分钟。

5) 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液。小心勿触碰 DNA 沉淀。将平板倾斜 30-45° 角自然干燥 10-15 分钟。

6) 向每孔加入 25ul 的 DNA Rehydration Solution, 室温或 4°C 过夜溶解。

7) 2-8°C 保存 DNA。

注释: V 底 96 孔板十分易于收集小量 DNA, 使用前只需稍加离心即可。

V. 从组织培养细胞和动物组织中提取基因组 DNA

请使用者准备:

- 1.5ml 离心管
- 15ml 离心管
- 小型匀浆机 (Fisher Tissue Tearor, Cat.#15-338-55, 或其他同规格产品, 处理动物组织使用)
- 胰蛋白酶 (仅用于处理贴壁细胞)
- PBS
- 液氮 (处理鼠尾, 非必须; 冻融之用, 见步骤 1.4); 替代小型匀浆机进行组织研磨, 见步骤 2.2)
- 研钵和研槌 (非必须; 替代小型匀浆机进行组织研磨, 见步骤 2.b)
- 95°C 水浴 (非必须; 冻融之用, 见步骤 1.4)
- 37°C 水浴
- 室温异丙醇
- 室温 70% 乙醇
- 65°C 水浴 (非必须, 用于快速溶解 DNA)
- 0.5M EDTA (pH8.0) (处理鼠尾)
- 蛋白酶 K (20mg/ml, 溶于水中; 目录号 V3021, 处理鼠尾)

1. 组织培养细胞

- 1) 收集细胞并转移到 1.5ml 离心管中。如果是贴壁细胞, 收集前用胰蛋白酶消化。
- 2) 13,000-16,000 x g 离心 10 分钟沉淀细胞。
- 3) 移弃上清, 剩下沉淀和 10-50ul 残留液体。
- 4) 加入 200ul PBS 清洗细胞。按步骤 1.2), 离心并弃去 PBS。使用涡旋振荡器剧烈振荡使细胞重悬。

注释: 有些细胞 (比如 PC12) 在核细胞裂解液中裂解不够充分, 对这样的细胞, 在进行步骤 1.4) 之前, 可按下面操作先进行冻融: 按照步骤 1.4) 清洗细胞; 随即在液氮中冷冻。然后 95°C 水浴融解细胞。如此循环 4 次。

- 5) 加入 600ul 核裂解液, 反复吸放以裂解细胞, 直到可见的细胞块消失。

- 6) 向核裂解物中加入 3ul RNA 酶溶液并颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15-30 分钟, 室温冷却 5 分钟后再进行下一步操作。
- 7) 向室温的样品中加入 200ul 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟。然后置冰上冷却 5 分钟。
- 8) 13,000-16,000 x g 离心 4 分钟, 形成白色致密的蛋白沉淀。
- 9) 在一个干净的 1.5ml 小离心管中, 加入 600ul 室温异丙醇。小心移取上步中的上清 (含 DNA) 至此小离心管, 不要吸到蛋白沉淀。

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 保留剩余上清, 上清勿吸取得过于彻底。

- 10) 轻轻颠倒混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
- 11) 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。可见白色小块状 DNA 沉淀。小心弃去上清。
- 12) 加入 600ul 室温 70% 乙醇, 轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀, 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。
- 13) 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液, 此时 DNA 沉淀十分松弛, 需格外小心, 避免将沉淀吸入管中。
- 14) 将离心管倒置在干净的吸水纸上, 自然干燥 10-15 分钟。
- 15) 向离心管中加入 100ul DNA Rehydration Solution, 65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液几次。或者, 也可室温或 4°C 孵育过夜。
- 16) 储存 DNA 于 2-8°C。

2. 动物组织 (小鼠肝和小鼠脑)

- 1) 取 15ml 离心管一只, 加入 600ul 核裂解液, 置于冰上冷却。
- 2) 向该离心管内的冰冷核裂解液中加入 10-20mg 新鲜或解冻组织, 使用小型匀浆机匀浆 10 秒钟。将裂解物移至一 1.5ml 小离心管中。或者, 也可以用在液氮中预冷的研钵研槌研磨液氮中的组织。研磨后, 待液氮挥发, 转移 10-20mg 的研磨组织至已装有 600ul 核裂解液 1.5ml 离心管内。



Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤

- 3) 65°C 孵育该裂解物 15-30 分钟。
- 4) 向核裂解物中加入 3ul RNA 酶溶液并颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15-30 分钟，室温冷却 5 分钟后再进行下一步操作。
- 5) 待样品达到室温后，加入 200ul 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟。置于冰上冷却 5 分钟。
- 6) 13,000-16,000 x g 离心 4 分钟，可形成白色致密的蛋白沉淀。
- 7) 在一个干净的 1.5ml 小离心管中，加入 600ul 室温异丙醇。小心移取上步中的上清（含 DNA）至此小离心管，不要吸到蛋白沉淀。

注释：为避免 DNA 被蛋白污染，保留少许上清，勿吸取得过于彻底。

- 8) 轻轻颠倒混匀溶液，直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
- 9) 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。可见白色小块状 DNA 沉淀。小心弃去上清。
- 10) 加入 600ul 室温 70%乙醇，轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀，13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。
- 11) 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液，此时 DNA 沉淀十分松弛，需格外小心，避免将沉淀吸入管中。
- 12) 将离心管倒置在干净的吸水纸上，自然干燥 10-15 分钟。
- 13) 向离心管中加入 100ul DNA Rehydration Solution，65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可间断地轻弹管壁混匀溶液。或者，也可室温或 4°C 孵育过夜。
- 14) 储存 DNA 于 2-8°C。

3. 动物组织（鼠尾）

- 1) 对每一即将处理的样品，在离心管中加入 500ul 核裂解液和 120ul 0.5M EDTA 溶液（pH 8.0），置于冰上冷却。

注释：该溶液变冷后会浑浊。

- 2) 取 1.5ml 小离心管一只，加入 0.5-1cm 新鲜或解冻的鼠尾。

注释：可将鼠尾放进经过液氮预冷的研钵中，研磨成细粉。然后将细粉移至 1.5ml 小离心管中。

- 3) 取步骤 3.1) 中配制的 EDTA/核裂解液 600ul，加入装有鼠尾组织的离心管中。
- 4) 加入 17.5ul 蛋白酶 K 溶液（20mg/ml）。
- 5) 55°C 水浴轻缓振荡孵育过夜。或者，55°C 水浴振荡 3 小时，期间每一小时使用涡旋振荡器振荡样品一次。确保鼠尾组织被彻底消化。
- 6) 非必须：向核裂解物中加入 3ul RNA 酶溶液，颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15-30 分钟。室温冷却 5 分钟后再进行下一步操作。
- 7) 待样品已降至室温后，加入 200ul 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟。置于冰上冷却 5 分钟。
- 8) 13,000-16,000 x g 离心 4 分钟。形成白色致密的蛋白沉淀。
- 9) 小心移取上清（含 DNA）至一干净的装有 600ul 室温异丙醇的 1.5ml 小离心管中，勿吸到蛋白沉淀。

注释：为避免 DNA 被蛋白污染，保留少许上清，勿吸取得过于彻底。

- 10) 轻轻颠倒混匀溶液，直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
- 11) 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。可见白色小块状 DNA 沉淀。小心弃去上清。
- 12) 加入 600ul 室温 70%乙醇，轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀，13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。
- 13) 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液，此时 DNA 沉淀十分松弛，需格外小心避免将沉淀吸入管中。
- 14) 将离心管倒置在干净的吸水纸上，自然干燥 10-15 分钟。
- 15) 向离心管中加入 100ul DNA Rehydration Solution，65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可室温或 4°C 孵育过夜。
- 16) 2-8°C 保存 DNA。



Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤

VI. 从植物组织中提取基因组 DNA

请使用者准备:

- 1.5ml 小离心管
- 小离心管研磨棒, 或研钵和研槌
- 65°C 水浴
- 37°C 水浴
- 异丙醇, 室温
- 70% 乙醇, 室温

1. 叶片组织可用液氮冷冻, 再用离心管研磨棒或研钵研磨成很细的粉末。取 40mg 该粉末放入 1.5ml 离心管中。
2. 加入 600ul 核裂解液, 使用涡旋振荡器振荡 1-3 秒钟, 润湿该组织粉末。
3. 65°C 孵育 15 分钟。
4. 向该细胞裂解物中加入 3ul RNA 酶溶液, 颠倒离心管 2-5 次混匀。37°C 孵育 15 分钟。室温冷却 5 分钟后再进行下一步操作。
5. 加入 200ul 蛋白沉淀液, 并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟。
6. 13,000-16,000 x g 离心 3 分钟。沉淀的蛋白将形成致密小块。
7. 小心移取上清 (含 DNA) 至一已装有 600ul 室温异丙醇的干净的 1.5ml 小离心管中, 弃蛋白沉淀。

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 保留少许上清, 勿取得过于彻底。

8. 轻轻颠倒混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
9. 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。
10. 小心弃去上清。加入 600ul 室温 70% 乙醇, 轻轻颠倒离心管数次, 清洗 DNA 沉淀, 13,000-16,000 x g 室温离心 1 分钟。

11. 使用巴斯德吸管或测序加样枪头小心吸走乙醇溶液, 此时 DNA 沉淀十分松弛, 需格外小心避免将沉淀吸入管中。
12. 将离心管倒置在干净的吸水纸上, 自然干燥 15 分钟。
13. 向离心管中加入 100ul DNAREhydration Solution, 65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可室温或 4°C 孵育过夜。
14. 2-8°C 保存 DNA。

VII. 从酵母中提取基因组 DNA

请使用者准备:

- 1.5ml 小离心管
- YPD 液体培养基
- 50mM EDTA (pH 8.0)
- 20mg/ml 溶壁酶 (lyticase, Sigma Cat.# L2524)
- 37°C 水浴
- 异丙醇, 室温
- 70% 乙醇, 室温
- 65°C 水浴 (非必须, 用于快速溶解 DNA)

1. 取 1ml 在 YPD 培养液中培养了 20 小时的培养物放入 1.5ml 离心管中。
2. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟沉淀细胞。弃去上清。
3. 加入 293ul 50mM EDTA 彻底重悬细胞。
4. 加入 7.5ul 20mg/ml 的溶壁酶, 轻轻吸放 4 次混匀。
5. 37°C 孵育 30-60 分钟消化细胞壁, 冷却至室温。
6. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟, 移弃上清。
7. 向细胞沉淀加入 300ul 核裂解液, 轻轻吸放混匀。
8. 加入 200ul 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟。
9. 置于冰上 5 分钟。
10. 13,000-16,000 x g 离心 3 分钟。
11. 小心移取上清 (含 DNA) 至一干净的、已装有 300ul 室温异丙醇的 1.5ml 小离心管中。



Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 保留少许上清, 勿吸取得过于彻底。

12. 轻轻颠倒混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
13. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟。
14. 小心弃去上清, 将试管倒置于干净的吸水纸上, 然后再加入 300ul 室温 70%乙醇, 轻轻颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀。
15. 13,000-16,000 x g 室温离心 2 分钟。小心吸走所有乙醇。
16. 将离心管倒置在干净的吸水纸上, 自然干燥 10-15 分钟。
17. 加入 50ul DNA Rehydration Solution。
18. 向纯化的 DNA 样品中加入 1.5ul RNA 酶溶液。剧烈振荡 1 秒钟。利用小型离心机离心 5 秒钟收集贴在管壁上的液体, 37°C 孵育 15 分钟。
19. 65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可室温或 4°C 孵育过夜。
20. 2-8°C 保存 DNA。

VIII. 从革兰氏阴性、阳性菌中提取基因组 DNA

请使用者准备:

- 1.5ml 小离心管
- 80°C 水浴
- 37°C 水浴
- 异丙醇, 室温
- 70%乙醇, 室温
- 65°C 水浴 (非必须, 快速溶解 DNA 之用)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (革兰氏阳性菌)
- 10mg/ml 溶菌酶(lysozyme, Sigma Cat.# L7651)(革兰氏阳性菌)
- 10mg/ml 溶葡萄球菌酶 (lysostaphin, Sigma Cat.# L7386) (革兰氏阳性菌)

1. 取 1ml 过夜培养物至 1.5ml 离心管中。
2. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟收集细胞。移弃上清。

对于革兰氏阳性菌, 接步骤 3。对于革兰氏阴性菌, 直接转到步骤 6。

3. 加入 480ul 50mM EDTA 重悬细胞。
4. 加入 120ul 适当的裂解酶类 (见下面注释), 并轻轻反复吸放混匀。这步预处理可达到削弱细胞壁、有效进行细胞裂解之目的。

注释: 对于葡萄球菌, 需 60ul 10mg/ml 溶菌酶和 60ul 10mg/ml 溶葡萄球菌酶共同消化以有效进行裂解。而对于很多革兰氏阳性菌株 (例如, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*、豚鼠奴卡菌 *Nocardia otitidiscaviarum*、紫红红球菌 *Rhodococcus rhodochrous*、乳白短杆菌 *Brevibacterium albidium*) 只需溶菌酶即可有效裂解。

5. 37°C 孵育 30-60 分钟。13,000-16,000 x g 离心 2 分钟, 移弃上清。
6. 加入 600ul 核裂解液, 轻轻吸放直至细胞重悬。
7. 80°C 孵育 5 分钟裂解细胞, 冷却至室温。
8. 向细胞裂解物中加入 3ul RNA 酶溶液, 颠倒离心管 2-5 次混匀。
9. 37°C 孵育 15-60 分钟, 冷却至室温。
10. 加入 200ul 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 秒钟, 将溶液与细胞裂解物充分混匀。
11. 冰上孵育 5 分钟。
12. 13,000-16,000 x g 离心 3 分钟。
13. 移取上清(含 DNA)至一干净的已装有 600ul 室温异丙醇的 1.5ml 小离心管中。

注释: 为避免 DNA 被蛋白污染, 保留少许上清, 勿吸取得过于彻底。

14. 轻轻颠倒混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀。
15. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟。
16. 弃去上清, 将离心管倒置在干净的吸水纸上。加入 600ul 室温 70%乙醇, 轻柔颠倒离心管数次清洗 DNA 沉淀。
17. 13,000-16,000 x g 离心 2 分钟。小心吸走乙醇。
18. 将离心管倒置在干净的吸水纸上, 自然干燥 10-15 分钟。

Wizard®基因组 DNA 纯化试剂盒简明操作步骤



<p>19. 向离心管中加入 100ul DNA Rehydration Solution, 65°C 孵育 1 小时溶解 DNA。期间可轻弹管壁混匀溶液。也可室温或 4°C 孵育过夜。</p> <p>20. 2-8°C 保存 DNA。</p> <p>IX. 附录</p> <p>A. 缓冲液和溶液的组成</p> <p>DNA Rehydration Solution (试剂盒提供)</p>	<p>10mM Tris-HCl (pH 7.4) 1mM EDTA (pH 8.0)</p> <p>RNA 酶 A</p> <p>将 RNA 酶 A 溶于 DNA Rehydration Solution, 浓度为 4mg/ml, 煮沸 10 分钟, 灭活污染的 DNA 酶, 分装后-20°C 保存。RNA 酶 A 溶液也可从 Promega 购买 (目录号 A7973)。</p>
--	--

X 表 1. 不同起始材料的 DNA 产量

物种和材料	起始量	一般 DNA 产量	RNA 酶处理
人全血			
(产率取决于存在的白细胞的数目)	300ul	5-15ug	非必须
	1.0ml	25-50ug	非必须
96 孔板 (可处理少至 20ul/孔, 见表 2)	10.0ml	250-500ug	非必须
	50ul/孔	0.2-0.7ug	非必须
小鼠全血			
EDTA (4%) 处理的	300ul	6ug	非必须
肝素 (4%) 处理的	300ul	6-7ug	非必须
96 孔板	50ul/孔	0.2-0.7ug	非必须
细胞系			
K562 (人)	3x10 ⁶ 个	15-30ug	必需
COS(非洲绿猴)	1.5x10 ⁶ 个	10ug	必需
NIH3T3(小鼠)	2.25x10 ⁶ 个	9.5-12.5ug	必需
PC12 (大鼠嗜铬细胞瘤)	8.25x10 ⁶ 个	6ug	必需
CHO(仓鼠)	1-2x10 ⁶ 个	6-7ug	必需
动物组织			
小鼠肝脏	11mg	15-20ug	必需
小鼠尾	0.5-1cm	10-30ug	非必须
昆虫			
Sf9 细胞	5x10 ⁶ 个	16ug	必需
植物组织			
马铃薯叶	40mg	7-12ug	必需

物种和材料	起始量	一般 DNA 产率	RNA 酶处理
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌 JM109	1ml	20ug	必需
过夜培养物	5ml	75-100ug	必需
~2x10 ⁹ 个细胞/ml			
阴沟肠杆菌	1ml	20ug	必需
过夜培养物	5ml	75-100ug	必需
~6x10 ⁹ 个细胞/ml			
革兰氏阳性菌			
表皮葡萄球菌	1ml	6-13ug	必需
过夜培养物			
~3.5x10 ⁸ 个细胞/ml			
酵母			
酿酒酵母	1ml	4.5-6.5ug	必需
过夜培养物			
~1.9x10 ⁸ 个细胞/ml			