

版本号: DP121221

TIANamp Micro DNA Kit

微量样品基因组DNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP316

产品内容

产品组成	DP316 (50 preps)
缓冲液GA (Buffer GA)	15 ml
缓冲液GB (Buffer GB)	15 ml
缓冲液GD (Buffer GD)	13 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml
Proteinase K	1 ml
Carrier RNA	310 µg
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml
吸附柱CR2 (Spin Columns CR2)	50个
收集管 (2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	50个

储存条件

该试剂盒置于室温 (15-25℃) 干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37℃水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。Carrier RNA配置成储液后置于-20℃。

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，样品裂解后，DNA在高盐条件下与硅胶膜结合，在低盐、高pH值时DNA从硅胶膜上洗脱下来。

本试剂盒用于从小剂量的血液、干血点、血清/血浆、微量组织、漱口水、毛发、微切割组织等微量样品中提取基因组DNA，所得基因组DNA可直接用作PCR模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 自备试剂：无水乙醇；1 M DTT（提取毛囊毛发）
2. 样品使用量的确定：

微量样品DNA提取试剂盒技术指标

吸附柱最大容量	700 μ l
最小洗脱体积	20 μ l
抗凝全血（哺乳动物）	最大量100 μ l
样品使用最大量（动物组织）	最大量10 mg

3. 若缓冲液GA或GB中有沉淀，可在37°C水浴中重新溶解。
4. 所有的样品使用前请平衡到室温(15-25°C)。
5. 第一次使用试剂盒时，请按照试剂瓶上的提示在缓冲液GD和漂洗液PW中添加无水乙醇。
6. 为了确保从微量样本中得到更多的DNA，试剂盒配备了Carrier RNA。由于Carrier RNA本身是小核酸，所以得到的基因组测定OD260值会比真实值偏大，建议将得到的基因组直接用PCR进行检测。

Carrier RNA储存液的配制

在第一次使用Carrier RNA时，请将Carrier RNA（310 μ g）溶解在310 μ l RNase-Free ddH₂O中，将溶液分装储存于-20°C，此时该溶液的浓度为1 μ g/ μ l；该储存液应避免反复冻融，冻融次数不能超过3次。

一、从少量血中提取基因组DNA

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取1-100 μl 血液到1.5 ml的离心管中。
2. 不足100 μl 的血液样本加缓冲液GA补足到100 μl 。
3. 加入10 μl 的Proteinase K溶液。

注意：如果需要去除RNA，可加入5 μl RNase A (100mg/ml) 溶液(目录号：RT405-11)，振荡15 sec，室温放置5 min。

4. 加入100 μl 的缓冲液GB（如果最初所取血液样品体积为1-10 μl ，请加入1 μl Carrier RNA 储存液，浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，Carrier RNA储存液的配制见第2页），轻轻颠倒混匀，简短离心以去除管盖内壁的液滴。56 $^{\circ}\text{C}$ 温浴10 min，并不时轻摇样品。

注意：加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀，一般56 $^{\circ}\text{C}$ 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

5. 加入50 μl 乙醇（96-100%），如果室温超过25 $^{\circ}\text{C}$ ，请将乙醇置冰上预冷。轻轻颠倒混匀样品，室温放置3 min。简短离心以去除管盖内壁的液滴。
6. 将上一步所得溶液都加到一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 $\times g$)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μl 缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 $\times g$)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
8. 向吸附柱CR2中加入600 μl 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 $\times g$)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

二、从干血点中提取基因组DNA

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取三片3×3 mm的样品到1.5 ml的离心管中。
2. 加入180 μl的缓冲液GA。
3. 加入20 μl Proteinase K溶液，轻轻颠倒混匀。56℃孵育1 h，期间每10 min涡旋10 sec。
4. 加入200 μl的缓冲液GB和1 μl Carrier RNA储存液，浓度为1 μg/μl（Carrier RNA储存液的配制见第2页），轻轻颠倒混匀，70℃孵育10 min，期间每3 min涡旋10 sec。孵育结束后简短离心以去除管盖内壁的液滴。

注意：加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀，一般70℃放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

5. 加入200 μl的乙醇（96-100%）。如果室温超过25℃，请将乙醇置冰上预冷。轻轻颠倒混匀样品，室温放置5 min，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
6. 将上一步所得溶液都加到一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μl缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
8. 向吸附柱CR2中加入600 μl漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

三、从血清/血浆中提取循环核酸/游离核酸

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取100 μ l -200 μ l血清/血浆到2ml的离心管中，如不足100 μ l，加缓冲液GA到100 μ l终体积。
2. 加入20 μ l Proteinase K溶液，涡旋混匀。
3. 加入200 μ l的缓冲液GB（如血清/血浆体积 <50 μ l，可加入1 μ l Carrier RNA储存液，浓度为1 μ g/ μ l，Carrier RNA储存液的配制见第2页），轻轻颠倒混匀，56 $^{\circ}$ C 孵育10 min，并不时摇动样品。简短离心以去除管盖内壁的液滴。

注意：加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀，一般56 $^{\circ}$ C 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

4. 加入200 μ l的乙醇（96-100%）。如果室温超过25 $^{\circ}$ C，请将乙醇置冰上预冷。轻轻颠倒混匀样品，室温放置5 min，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
5. 将上一步所得溶液添加到一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
6. 向吸附柱CR2中加入500 μ l缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入600 μ l 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

8. 重复操作步骤7。

9. 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

10. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

四、从漱口水中提取基因组DNA

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 在50 ml无菌管中添加10-20 ml漱口水产品，800 rpm (~1,800×g) 离心5 min，将上清小心倒掉。
2. 向沉淀中添加200 μl缓冲液GA重悬，将全部悬液转移至1.5 ml离心管中。
3. 加入20 μl Proteinase K溶液，涡旋10 sec混匀，56°C放置60 min，期间每15 min涡旋混匀数次。
4. 加入200 μl缓冲液GB 和1 μl Carrier RNA储存液，浓度为1 μg/μl（Carrier RNA储存液的配制见第2页），充分颠倒混匀，70°C放置10 min，期间每3 min涡旋10 sec。此时溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的液滴。

注意：加入缓冲液GB时可能会产生白色沉淀，一般70°C 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

5. 加200 μl无水乙醇，充分颠倒混匀，简短离心以去除管盖内壁的液滴。

注意：加入无水乙醇后可能会出现絮状沉淀，但不影响DNA提取。

6. 将上一步所得溶液和絮状沉淀加入一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μl缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
8. 向吸附柱CR2中加入600 μl 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400×g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400×g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2min，12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内(可以用NaOH将水的pH值调到此范围)，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

五、从毛囊中提取基因组DNA

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

请提前准备1M DTT溶液。

1. 材料处理：含毛囊的毛发：在1.5 ml离心管中加入250 μ l缓冲液GA，20 μ l蛋白酶K，20 μ l 1 M DTT，混匀。从毛发根部毛囊处取1 cm长的一段，与上述溶液涡旋混匀10 sec。
2. 在56 $^{\circ}$ C 孵育直到样本充分降解消化。需要时间至少60 min，期间每隔20 min涡旋10 sec混匀；或者置于水浴振荡仪中消化。简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。

注意：裂解时间根据样本不同有所差异，一般毛发需要1 h；过夜消化也可，且过夜消化对整个实验没有太大影响。羽茎样本不会完全消化，对于未消化完全的羽茎样本，可以直接离心，取上清液进行后续实验。

3. 添加300 μ l缓冲液GB和1 μ l Carrier RNA储存液，浓度为1 μ g/ μ l（Carrier RNA储存液配置见第2页），充分混匀。
4. 56 $^{\circ}$ C 水浴10 min，期间每3min涡旋混匀10 sec。
5. 添加300 μ l 无水乙醇，充分涡旋混匀。简短离心以去除管盖内壁的液滴。
6. 将上一步所得溶液和絮状沉淀分两次加入一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μ l缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

8. 向吸附柱CR2中加入600 μ l 漂洗液PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μ l 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400 \times g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μ l，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防DNA降解。

六、从微量组织中提取基因组DNA

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取不超过10 mg的组织到1.5 ml的离心管中，立即加入180 μ l缓冲液GA，室温放置，使离心管温度平衡到室温。
2. 加入20 μ l Proteinase K溶液，涡旋混匀10 sec。
3. 在56 $^{\circ}$ C 孵育直到样本充分降解消化，需要时间大约30 min到1h，期间每15 min需要涡旋混匀；或者置于水浴振荡仪中消化。简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。
4. 加入200 μ l的缓冲液GB和1 μ l Carrier RNA储存液，浓度为1 μ g/ μ l（Carrier RNA储存液的配制见第2页），充分颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C放置10 min，期间每3 min涡旋混匀10 sec，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
5. 加入200 μ l的乙醇（96-100%）。如果室温超过25 $^{\circ}$ C，请将乙醇置冰上预冷。轻轻颠倒混匀样品，室温放置5 min，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
6. 取上一步所得溶液全部转入吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μ l缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
8. 向吸附柱CR2中加入600 μ l 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。

9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min, 倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置2-5 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB, 室温放置2-5 min, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min, 将溶液收集到离心管中。

注意: 洗脱缓冲液体积不应少于20 μl , 体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率, 可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中, 室温放置2 min, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内, pH值低于7.0会降低洗脱效率; 且DNA产物应保存在 -20°C , 以防DNA降解。

七、从微切割样品中提取基因组DNA（包括福尔马林固定的微切割样品）

操作步骤

使用前请先在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 加入15 μl 缓冲液GA到0.2 ml离心管中，放入微切割样品。
2. 加入10 μl 蛋白酶K溶液，涡旋混匀10 sec。
3. 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h使样本充分降解消化。若福尔马林样品需要孵育16 h，期间隔段时间需要涡旋混匀；或者置于水浴振荡仪中消化。简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。
4. 加入25 μl 缓冲液GA，混匀。再加入50 μl 缓冲液GB和1 μl Carrier RNA储存液，浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （Carrier RNA储存液的配制见第2页），涡旋混匀10 sec，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
5. 加入50 μl 的乙醇（96-100%）。如果室温超过25 $^{\circ}\text{C}$ ，请将乙醇置冰上预冷。轻轻颠倒混匀样品，室温放置5min，简短离心以去除管盖内壁的液滴。
6. 取上一步所得溶液添加到一个吸附柱CR2中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
7. 向吸附柱CR2中加入500 μl 缓冲液GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
8. 向吸附柱CR2中加入600 μl 漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec，弃废液，将吸附柱CR2放回收集管中。
9. 重复操作步骤8。

10. 12,000 rpm (~13,400 × g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR2置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将吸附柱CR2转入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μl 洗脱缓冲液TB，室温放置2-5 min，12,000 rpm(~13,400 × g)离心2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于20 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组DNA的得率，可将离心得到的溶液再次加入吸附柱CR2中，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 × g)离心2 min。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。