

组织（细胞）DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

组织（细胞）DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从各种组织、培养细胞（革兰氏阴性细菌）以及各种体液或拭子细胞中分离纯化出高质量、高浓度的基因组 DNA。

【检验原理】

破坏组织，释放细胞。裂解吸附液和蛋白酶 K 使 DNA 与蛋白质分离。在裂解吸附液高盐低 pH 的环境下，吸附柱内的硅胶膜高效吸附分离的 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附的 DNA，从而达到快速分离纯化基因组 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	成分组成	50T	100T	200T
MDT-TCDD01	裂解吸附液 D	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	蛋白酶 K	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	RNA 清除剂	500μL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 支
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 B	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

蛋白酶 K：常温（10-30℃）运输，-20℃保存；

RNA 清除剂：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。**有效期 1 年。**

【注意事项】使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 洗脱液的使用量太少会影响提取效果。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
5. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
6. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜、液氮中保存或组织保存液中保存的组织或细胞（革兰氏阴性细菌）；新鲜的尿液、胸腹水、肺泡灌洗液、脑脊液等体液以及各种拭子样本。

【适用范围】

≤5.0×10⁶ 个细胞；≤2.0×10⁹ 个革兰氏阴性菌；≤20mg 动物组织；≤100mg 植物组织。

【样本用量及 DNA 得率】

样本类型	样本用量	DNA 得率 (μg)
上皮细胞	5.0×10^6 个	20-30
对数生长期大肠杆菌	1mL	15-20
肝组织	$\leq 10\text{mg}$	15-50
肾组织	$\leq 10\text{mg}$	20-100
肠组织	$\leq 10\text{mg}$	20-70
胃组织	$\leq 10\text{mg}$	20-70
脂肪组织	$\leq 20\text{mg}$	3-15
叶	$\leq 30\text{mg}$	2-10
苹果核	$\leq 30\text{mg}$	6-25

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000 \times g$ ）、高速匀浆器（研钵、液氮）、振荡仪、金属浴、1.5mL 离心管、生理盐水和无水乙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。

【样本处理】

一、细胞样本的处理

- 1. 贴壁生长细胞：**在指数生长期，取适量胰酶消化后的细胞加入 1.5mL 离心管中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。
- 2. 液体培养细胞：**在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的培养细胞的悬液（或者已计数的细胞悬液）， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。
- 3. 细胞保存液保存的细胞：**取出细胞保存液保存的细胞， 37°C 水浴中摇动至完全融化。取适量细胞转入 1.5mL 离心管中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。
- 在沉淀中加入 $200\mu\text{L}$ 生理盐水，充分悬浮沉淀。

二、革兰氏阴性样本的处理

- 1. 液体培养细胞的革兰氏阴性细菌：**在 1.5mL 离心管中加入适量处于指数生长期的革兰氏阴性细菌悬液（或者已计数的细胞悬液）， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

2. 固体培养的革兰氏阴性细菌：用接种环刮取一定量的革兰氏阴性细菌，加入含 1mL 生理盐水的 1.5mL 离心管中，充分混匀， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

3. 在上述沉淀中加入 500 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。 $12,000\times g$ 离心 1 分钟。弃上清，保留沉淀。

►残留的培养基（保存液）能影响 DNA 的纯度和提取效率，对细胞（细菌）进行 1 次洗涤能明显改善 DNA 纯度和提取效率。

4. 在沉淀中加入 200 μ L 生理盐水，充分悬浮沉淀。

三、体液（拭子）样本的处理

1.1 体液样本：在 1.5mL 离心管中加入一定量的体液样本， $12,000\times g$ 离心 1 分钟。吸弃上清，保留细胞沉淀。

1.2 各种拭子（宫颈刷）样本：将拭子（宫颈刷）在生理盐水中振荡 20 秒。取 1mL 振荡后的生理盐水加入至 1.5mL 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 分钟，弃上清，保留细胞沉淀。

2. 在细胞沉淀中加入 200 μ L 生理盐水悬浮细胞沉淀。

四、动物组织的处理

按下表说明使用组织的量

高丰度 DNA 的组织（如肌肉、心脏、肝、脾、胰、脑、胚胎、肾、肺、卵巢、胸腺等）	$\leq 10\text{mg}$
低丰度 DNA 的组织（膀胱、皮肤、脂肪）	$\leq 20\text{mg}$

1. 液氮研磨法

1.1 取 $\leq 20\text{mg}$ 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。

1.2 将组织粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。用 200 μ L 生理盐水悬浮组织粉末。

2. 高速匀浆法

2.1 新鲜组织的处理

2.1.1 取 $\leq 20\text{mg}$ 的新鲜组织，尽量剪碎后转入 2mL 平底离心管，加入 300 μ L 生理盐水，用高速匀浆器充分匀浆。

►新鲜组织需用剪刀尽量剪碎再进行匀浆。

2.1.2 吸取 200 μ L 匀浆液转入至 1.5mL 离心管中。

2.2 组织保存液保存组织的处理

2.2.1 用镊子取出组织保存液（MDT-TP01）保存的组织（冷冻的保存液需 37°C 振荡孵育至保存液完全融化），转入 1.5mL 离心管中。

2.2.2 加入 1mL 75% 乙醇漂洗 1 次，取出组织块用吸水纸将乙醇吸干。尽量剪碎组织，称取 ≤ 20mg 的组织，转入 2mL 平底离心管。

► 组织需尽量剪碎。

2.2.3 在离心管中加入 300μL 生理盐水，使用匀浆器充分匀浆。

2.2.4 吸取 200μL 匀浆液转入至 1.5mL 离心管中。

► 组织使用前应尽量搅碎（捣碎）。

► 为了确保 DNA 的提取效率，组织匀浆必须充分。

► 匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂和泡沫产生。

五、植物组织的处理

按下表说明使用植物组织的量

植物种子和嫩叶	10-30mg
植物纤维组织	30-100mg

1. 液氮研磨法

1.1 取 ≤ 100mg 细碎的植物组织，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。

1.2 将组织粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。用 200μL 生理盐水悬浮组织粉末。

2. 高速匀浆法

2.1 取 ≤ 100mg 细碎的植物组织，尽量搅碎（捣碎）后转入 2mL 平底离心管，加入 300μL 生理盐水，高速匀浆器充分匀浆。

2.2 吸取 200μL 匀浆液转入至 1.5mL 离心管中。

► 植物组织使用前应尽量搅碎（切碎）。

► 组织匀浆必须充分，确保 DNA 的提取效率。

► 匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂和泡沫产生。

► 匀浆后 5,000rpm 离心 10 秒可以消除泡沫。

【标准操作步骤】

1A. 高纯度 DNA 提取的操作

①在含已处理样本的 1.5mL 离心管中加入 10 μ L RNA 清除剂，混匀后瞬时离心，42℃静置孵育 5 分钟。

②取出 1.5mL 离心管，加入 200 μ L 裂解吸附液 D 和 20 μ L 蛋白酶 K，充分混匀，瞬时离心，60℃静置孵育 10 分钟。

1B. 普通纯度 DNA 提取的操作

在含已处理样本的 1.5mL 离心管中加入 200 μ L 裂解吸附液 D、20 μ L 蛋白酶 K 和 10 μ L RNA 清除剂，充分混匀，瞬时离心，60℃静置孵育 10 分钟。

►有些组织（比如肝、脾组织）或细胞中含有丰富的 RNA，RNA 残留会抑制某些下游酶实验。如果要获得无 RNA 残留的 DNA 提取物可选择“步骤 1A”；如果对 RNA 残留无特殊要求可选择“步骤 1B”。

2A. 细胞（细菌）样本

开盖，直接加入 200 μ L 无水乙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

2B. 组织样本

取出离心管，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，吸取 400 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中。加入 200 μ L 无水乙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

3. 闭盖 12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L RAW1，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

►加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L 无水乙醇，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

7. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000 $\times$ g 离心 3 分钟，丢弃离心管。

8. 将吸附柱转入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 100 μ L 洗脱液 B 至吸附柱中心。闭盖室温静置 3 分钟，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

►洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整，但不得低于 30 μ L。

【组织（细胞）DNA 提取（柱式法）常见问题解答】

DNA 提取常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	1. 样本使用量过多	减少样本使用量，动物组织不超过 20 mg，植物组织不超过 100 mg，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 组织研磨或匀浆不充分	肌肉、心脏以及皮肤等富含肌纤维的样本建议采用液氮研磨方式处理；若使用高速匀浆法，则需增加研磨时间和力度。
未提取到 DNA 或产量低	1. 样本使用量过少	增加样本使用量，动物组织不超过 20 mg，植物组织不超过 100 mg，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 DNase 导致 DNA 降解。采用新鲜、液氮保存或保存液保存的样本。
	3. 组织研磨或匀浆不充分	增加研磨或匀浆时间和力度。
	4. 样本裂解不充分	蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K。
	5. 乙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入无水乙醇。
	6. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	7. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，乙醇含量达 80%。
	8. 洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65℃ 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。
DNA 降解或断裂	1. 样本未及时保存或保存不当	采用新鲜、液氮保存或组织保存液保存的样本。
	2. 样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
	3. 匀浆速度太快或时间太长。	降低匀浆速度，较少匀浆时间
纯度低	1. 盐离子残留	避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。
	2. 蛋白残留	有些样本蛋白含量较高，容易导致蛋白残留。减少样本使用量；加入 RAW1 后闭盖静置 30 秒；增加 1 次 RAW1 洗涤。
	3. 乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000×g 再离心 3 分钟。
RNA 残留	1. 样本使用量过高	不同样本 RNA 含量相差大，减少样本使用量，动物组织不超过 20 mg，植物组织不超过 100 mg，细胞不超过 5×10^6 个，革兰氏阴性细菌不超过 2.0×10^9 个。
	2. 样本处理时未加入 RNA 清除剂	按说明书正确加入 RNA 清除剂。

【说明书编制日期】 2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564 138 6175 7779