

组织 DNA 提取试剂盒

E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit

货号	D3396-00	D3396-01	D3396-02
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind [®] DNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	10 个	100 个	400 个
BL Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
TL Buffer	5 mL	20 mL	60 mL
HBC Buffer	3 mL	25 mL	80 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 20 mL
Elution Buffer	5 mL	30 mL	120 mL
OB Protease Solution	140 μ L	1.4 mL	4 x 1.4 mL
User Manual	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. OB Protease Solution 室温可放置 12 个月，长期保存建议放置 2-8°C；
3. 当贮存温度较低时，TL Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
4. 本试剂盒仅限科学研究使用。

★ 实验前准备

1. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存；

货号	DNA Wash Buffer 稀释	HBC Buffer 稀释
	无水乙醇 加入量	异丙醇 加入量
D3396-00	8 mL	1.2 mL

货号	DNA Wash Buffer 稀释	HBC Buffer 稀释
	无水乙醇 加入量	异丙醇 加入量
D3396-01	60 mL	10 mL
D3396-02	80 mL (每瓶)	32 mL

★ 提取步骤 —— 动物组织样品

用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 温度可达 55-70°C 的孵育装置
- ✓ 涡旋仪
- ✓ (可选) RNase A (100mg/mL)

1. 将 30mg 组织样品切碎，转移到 1.5mL 离心管中；

2. 加入 200 μ L TL Buffer；

注意：为了加速裂解，可以把组织切成小块。样品如果超过 30mg，需要加大 TL Buffer 的加入量，例如：40-60mg 组织加 400 μ L TL Buffer。

3. 加入 25 μ L OB Protease Solution，涡旋混匀；

4. 于水浴锅中 55°C 孵育。

注意：如果使用的水浴锅不带震动混匀功能，每隔 20-30min 对样品涡旋混匀一次，样品裂解时间取决于样品量以及类型，通常不超过 3 小时，不易裂解的样品可以消化过夜。

可选：某些含 RNA 量多的组织如肝组织，使用该试剂盒提取 DNA，RNA 会和被一起提取得到。虽然 RNA 存在不影响 PCR 实验，但如果有需要去除，可以按照以下步骤操作：

1. 每 30mg 组织加入 4 μ L RNase A (100mg/mL) ；

2. 室温放置 2min；

3. 按照步骤 5 继续操作。

5. 常温最大速度(> 13,000xg)离心 5min 去除不溶解的杂质;
6. 转移上清液到新的 1.5mL 离心管中, 小心注意不要吸到任何沉淀;
7. 加入 220 μ L BL Buffer, 涡旋混匀; BL Buffer 的加入量需要根据起始样品量来调整, 例如: 加入 400 μ L TL Buffer, 则需添加 420 μ L BL Buffer 和 420 μ L 无水乙醇。
注意: 加入 BL Buffer 后可能会形成絮状沉淀, 但这不影响 DNA 的回收。
8. 70°C 孵育 10min;
9. 加入 220 μ L 无水乙醇, 涡旋彻底混匀; 无水乙醇的加入量需要根据起始样品量来调整;
10. 将 HiBind[®] DNA Mini Columns 套入收集管中, 转移第 9 步得到的混合液到结合柱中 (每次转移的混合液 \leq 700 μ L), 室温 12,000xg 离心 1min, 弃滤液;
11. 重复步骤 10, 直至所有混合液都结合到 HiBind[®] DNA Mini Columns 上;
12. 将 HiBind[®] DNA Mini Columns 套入收集管中, 加入 500 μ L HBC Buffer (已加异丙醇正确稀释) 至结合柱中, 12,000xg 离心 30s, 弃滤液;
注意: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书用异丙醇进行稀释。
13. 将 HiBind[®] DNA Mini Columns 套回收集管中, 加入 700 μ L DNA Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释) 至结合柱中, 12,000xg 离心 1min, 弃滤液;
注意: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书用无水乙醇进行稀释。
14. 重复步骤 13 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;
15. 将 HiBind[®] DNA Mini Columns 套回收集管中, 12,000xg 离心空甩 2min;
16. 将 HiBind DNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 100-200 μ L 70°C 预热的 Elution Buffer 至结合柱中, 室温放置 2min, 然后 12,000xg 离心 1min 洗脱 DNA,
17. 重复步骤 16 进行二次洗脱, 产物放置 -20°C 保存。
 - 首次 200 μ L 洗脱可获得 60-70% 的 DNA, 二次洗脱可以达到 90%。

- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱(可增加产量,但会导致浓度降低)。
- 为了获得更高浓度的 DNA, 可以使用 50-100 μ L Elution Buffer 进行洗脱(会稍微降低总 DNA 产量)。体积低于 50 μ L 会大大降低产量。
- 可以在加入 Elution Buffer 后, 至于 70 $^{\circ}$ C 孵育来提高洗脱效率。

★ 提取步骤 —— 细胞样品

用户自备仪器及耗材:

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇、PBS
- ✓ 温度可达 55-70 $^{\circ}$ C 的孵育装置
- ✓ 涡旋仪
- ✓ (可选) RNase A (100mg/mL)

1. 使用以下方法制备细胞悬浮液:

A) 实验前需要先把冰冻的细胞样品进行解冻。离心收集细胞, 然后用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞。再加入 200 μ L PBS 缓冲液重悬细胞, 接着按照步骤 2 进行操作。

B) 悬浮培养细胞, 吸取 5×10^6 个细胞, 1,200 xg 离心沉淀细胞, 然后倒弃细胞培养液, 接着用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞, 再加入 200 μ L PBS 缓冲液重悬细胞, 接着按照步骤 2 进行操作。

C) 贴壁生长细胞, 通过胰蛋白酶消化处理或者用橡皮刮刀把细胞刮下来, 然后用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞, 再加入 200 μ L PBS 缓冲液重悬细胞, 接着按照步骤 2 进行操作。

2. 加入 25 μ L OB Protease Solution, 涡旋混匀;

可选: 某些培养细胞含有高丰度的 RNA, 使用该试剂盒提取 DNA, RNA 会和被一起提取得到。虽然 RNA 存在不影响 PCR 实验, 但如果有需要去除, 可以按照以下步骤操作:

1. 每 5×10^6 个细胞加入 4 μ L RNase A (100mg/mL) ;

2. 室温放置 2min;
3. 按照步骤 3 继续操作。
3. 加入 220 μL BL Buffer, 涡旋混匀;
注意: 加入 BL Buffer 后可能会形成絮状沉淀, 这不影响 DNA 的回收。
4. 70°C 孵育 10min, 孵育过程中需偶尔颠倒混匀几次;
5. 加入 220 μL 无水乙醇, 涡旋彻底混匀, 无水乙醇的加入量需要根据起始样品量来调整;
6. 按照“动物组织提取流程”的步骤 10-17 继续操作。

★ 提取步骤 —— 小鼠尾巴样品

用户自备仪器及耗材:

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 温度可达 55-70°C 的孵育装置
- ✓ 涡旋仪
- ✓ (可选) RNase A (100mg/mL)

1. 剪下两段 0.2-0.5cm 长的小鼠尾巴放置于一新的 1.5 mL 无酶离心管中;
注意: 小鼠的年龄不应超过 6 周, 因为年龄较大的动物更难裂解, 导致 DNA 提取产量不理想。最好在 2-4 周时采样冻存于 -70°C, 需要时再进行提取。
2. 加 200 μL TL Buffer;
3. 加入 25 μL OB Protease Solution, 涡旋混匀;
4. 于水浴锅中 55°C 孵育 1-4 小时。
注意: 如果使用的水浴锅不带震动混匀功能, 每隔 20-30min 对样品涡旋混匀一次, 样品裂解时间取决于尾巴的长度以及小鼠年龄, 2 周鼠龄, 长度 0.5cm 大约裂解 2 小时, 鼠龄长的样品可以消化过夜来提高产量。骨头和毛发是不能被裂解的。

可选: 小鼠尾巴含的 RNA 比较少, 但使用该试剂盒提取 DNA, RNA 会和被一起提取得到。虽然 RNA 存在不影响 PCR 实验, 但如果有需要去除, 可以按照以下步骤操作:

1. 每 30mg 组织加入 4 μL RNase A (100mg/mL) ;
 2. 室温放置 2min;
 3. 按照步骤 5 继续操作。
5. 室温 12,000xg 离心 5min, 沉淀不溶性的组织碎片以及毛发; 转移上清液到一新的无菌 1.5 mL 离心管中, 注意不要吸到沉淀物;
6. 加入 1 倍上清体积的 BL Buffer 以及 1 倍上清的无水乙醇, 涡旋混匀;
例如: 如果转移的上清体积为 180 μL , 加 180 μL BL Buffer 以及 180 μL 无水乙醇。
- # **注意:** 加入 BL Buffer 后可能会形成絮状沉淀, 这不影响 DNA 的回收。
7. 按照“动物组织提取流程”的步骤 10-17 继续操作。

★ 提取步骤 —— 石蜡包埋组织样品

用户自备仪器及耗材:

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
 - ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
 - ✓ 无水乙醇、异丙醇、二甲苯
 - ✓ 温度可达 37-90°C 的孵育装置
 - ✓ 涡旋仪
 - ✓ (可选) RNase A (100mg/mL)
1. 将不超过 30mg 的石蜡切片组织 (约 2mm³) 放置于一新的 2 mL 无酶离心管中;
 2. 加入 1 mL 二甲苯, 涡旋混匀。室温 12,000xg 离心 5min, 弃上清;
 3. 加入 1 mL 无水乙醇, 涡旋混匀。室温 12,000xg 离心 5min, 弃上清;
 4. 重复步骤 3 进行二次洗涤;
 5. 打开离心管盖子, 于 37°C 干燥组织沉淀 15min;

6. 加入 200 μL TL Buffer, 25 μL OB Protease Solution, 涡旋混匀;
7. 置于水浴锅中 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育;
注意: 如果使用的水浴锅不带震动混匀功能, 每隔 20-30min 对样品涡旋混匀一次, 样品裂解时间取决于样品类型, 通常消化时间小于 3 小时, 也可以消化过夜。
8. 90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30-60min;
可选: 某些含 RNA 量多的组织如肝组织, 使用该试剂盒提取 DNA, RNA 会和被一起提取得到。虽然 RNA 存在不影响 PCR 实验, 但如果有需要去除, 可以按照以下步骤操作:
 1. 每 30mg 组织加入 4 μL RNase A (100mg/mL) ;
 2. 室温放置 2min ;
 3. 按照步骤 9 继续操作。
9. 室温 12,000 $\times g$ 离心 5min。转移上清液到一新的无菌 1.5 mL 离心管中, 注意不要吸到沉淀物;
10. 加入 220 μL BL Buffer, 涡旋混匀, BL Buffer 的加入量根据起始样品量进行调整;
注意: 加入 BL Buffer 后可能会形成絮状沉淀, 但这不影响 DNA 的回收。
11. 加入 220 μL 无水乙醇, 涡旋混匀; 无水乙醇的加入量根据起始样品量进行调整;
12. 按照“动物组织提取流程”的步骤 10-15 继续操作;
13. 将 HiBind DNA Mini Columns 套入新的 1.5mL 离心管中, 加入 50-100 μL 70 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 Elution Buffer 至结合柱中, 室温放置 2min, 然后 12,000 $\times g$ 离心 1min 洗脱 DNA;
14. 重复步骤 13 进行二次洗脱, 最后将 DNA 保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。
注意: 产量取决于样品类型, 大小以及保存年限。某些样品可能需要使用 TL Buffer 进行长时间的裂解。甲醛固定的样品, DNA 和 RNA 会发生降解的现象, 降解的程度取决于固定剂的类型, 所获得的 DNA 片段大小通常会 < 500bp, 降解并不是提取试剂盒造成的。

★ 提取步骤 —— 血液及体液样品

用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
 - ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
 - ✓ 无水乙醇、异丙醇、
 - ✓ 温度可达 55-70°C的孵育装置
 - ✓ 涡旋仪
 - ✓ (可选) RNase A (100mg/mL) 、PBS、10mM Tris-HCl
1. 吸取 250 μ L 样品到一无酶的 1.5 mL 离心管中,如果样品体积不够 250 μ L 使用 PBS、10mM Tris-HCl 或者 ELution Buffer 补足:
 2. 加入 25 μ L OB Protease Solution, 250 μ L BL Buffer, 涡旋混匀;
注意: 加入 BL Buffer 后可能会形成絮状沉淀, 但这不影响 DNA 的回收。
可选: 使用该试剂盒提取 DNA, RNA 会和被一起提取得到。虽然 RNA 存在不影响 PCR 实验, 但如果有需要去除, 可以按照以下步骤操作:
 1. 加入 4 μ L RNase A (100mg/mL) ;
 2. 室温放置 2min;
 3. 按照步骤 3 继续操作。
 3. 70°C孵育 10min, 孵育期间短暂涡旋一次混匀;
 4. 加入 250 μ L 无水乙醇, 涡旋彻底混匀;
 5. 按照“动物组织提取流程”的步骤 10-17 继续操作。

★ 提取步骤 —— 真空抽滤方案

用户自备仪器及耗材：

- ✓ 真空抽滤盒 (VAC-08)
- ✓ 离心转速可达 13,000xg 的小型离心机
- ✓ 无核酸酶的 1.5mL 离心管
- ✓ 无水乙醇、异丙醇、

- ✓ 温度可达 70°C的孵育装置
- ✓ 涡旋仪

1. 按照以下步骤准备好样品:

1. 第 2-3 页 “动物组织提取流程” 的步骤 1-9
2. 第 4-5 页 “细胞样品提取流程” 的步骤 1-5
3. 第 5-6 页 “小鼠尾巴样品提取流程” 的步骤 1-6
4. 第 7 页 “石蜡包埋组织提取流程” 的步骤 1-11
5. 第 8 页 “血液与体液样品提取流程” 的步骤 1-4

2. 加入 25 μ L OB Protease Solution, 250 μ L BL Buffer, 涡旋混匀;
3. 按英文使用说明准备好真空抽滤器, 把 HiBind[®] DNA Mini Column 连接到抽滤器;
4. 转移裂解液到 HiBind[®] DNA Mini Column, 小心不要超过结合柱的容积 (700 μ L), 用真空抽滤让裂解液通过结合柱, 转移剩下的裂解液到结合柱, 抽滤, 直到所有的裂解液都通过结合柱;
5. 加 500 μ L HBC Buffer (已加异丙醇正确稀释) 到 HiBind[®] DNA Mini Column, 抽滤让液体流过结合柱;
6. 洗涤结合柱: 加 700 μ L DNA Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释), 抽滤;
7. 重复步骤 6, 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;
8. 弃去滤液, 把 HiBind[®] DNA Mini Column 重新装回收集管, 最大速度离心空柱 2min 以甩干结合柱基质;
9. 把 HiBind[®] DNA Mini Column 装在干净的 1.5mL 离心管上, 加入 50-200 μ L Elution Buffer 到结合柱基质中, 静置 2min, 13,000xg 离心 1min 洗脱出 DNA;

注意:

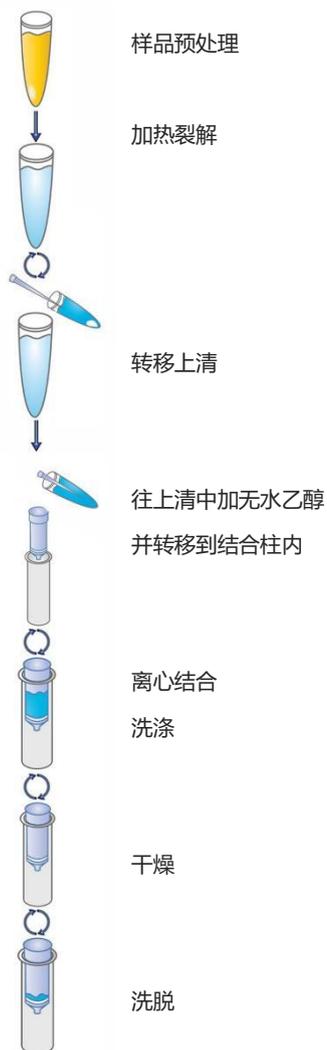
- 首次 200 μ L 洗脱可获得 60-70%的 DNA, 二次洗脱可以达到 90%。
- 用新的 Elution Buffer 进行二次洗脱(可增加产量, 但会导致浓度降低)。

- 为了获得更高浓度的 DNA, 可以使用 50-100 μ L Elution Buffer 进行洗脱 (会稍微降低总 DNA 产量)。体积低于 50 μ L 会大大降低产量。
- 可以在加入 Elution Buffer 后, 至于 70 $^{\circ}$ C 孵育来提高洗脱效率。

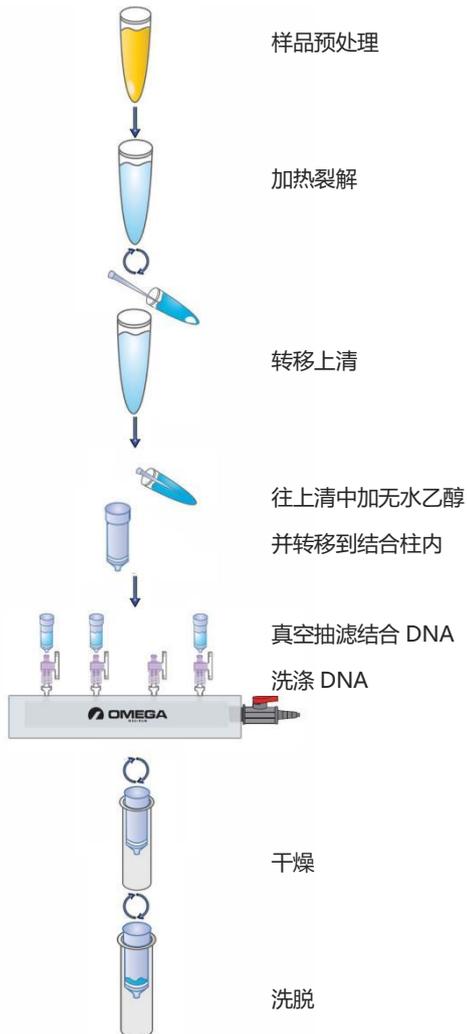
10. 将洗脱的 DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C。

★ 提取步骤示意图

离心操作流程



真空抽滤操作流程



★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：**omegabiotek.com.cn**

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。