



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-06931

[http:// www.real-times.com.cn](http://www.real-times.com.cn)

E-mail: real-times@vip.163.com

昆虫基因组 DNA 提取试剂盒

Insect Genomic DNA Isolation Kit

● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTG2408 (50 次)	贮存方式
缓冲液 IL	22 ml	常温
缓冲液 IB (浓缩液)	26 ml	常温
缓冲液 LF	16 ml	常温
DNA Wash Buffer (浓缩液)	65 ml	常温
缓冲液 WB(浓缩液)	30 ml	常温
洗脱缓冲液 EB	15 ml	常温
蛋白酶 K	1.05 ml	-20℃
RNase A	220 μ l	-20℃
吸附柱 CG (含收集管)	50 套	常温
说明书	1 份	

● 储存条件和效期:

室温保存, 12 个月内有效。缓冲液 IL 与缓冲液 IB 可能有沉淀产生, 37℃ 水浴溶解后即可。

RNase A 和蛋白酶 K 常温运输, -20℃ 保存。

● 产品简介:

该试剂盒采用独特的裂解液能够有效除去多糖多酚等, 能够从昆虫、软体动物、节肢动物、蛔虫等样品中提取 DNA, 保存在醇类的样品也适用于本试剂盒的提取。一次操作可以处理小于 50mg 组织, 样品经裂解液消化, 氯仿分离除去大部分的多糖多酚, 再经分离柱进一步纯化, 便可得到高纯度的 DNA。所得的 DNA 可以用于 PCR, Southern 杂交, 酶切消化等实验。

● 准备工作:

1. 准备 65℃ 水浴; 无水乙醇; 制冰机; 1.5ml 离心管; 2ml 离心管
2. 按照标签所示在缓冲液 IB 中加入异丙醇, 在 DNA Wash Buffer 和缓冲液 WB 中加入无水乙醇, 混匀后盖紧瓶盖后常温贮存备用。
3. 每次使用前请检查缓冲液 IL, 缓冲液 IB 是否有沉淀生成, 如果出现沉淀, 37℃ 温浴至沉淀溶解后再使用。

● 标准操作步骤:

除非指出,所有离心步骤均为使用台式离心机在常温下离心。

1. 液氮充分研磨样品。
2. 收集研磨成粉末的 50 mg 样品,置于 1.5ml 离心管中。
3. 加入 350 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的缓冲液 IL,并加入 20 μ l 蛋白酶 K 剧烈地漩涡振荡,确保所有的组织团都分散均匀。
4. 65 $^{\circ}$ C 水浴 20-30min。水浴期间颠倒样品数次。
5. 加入 300 μ l 缓冲液 LF,充分混匀,12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 5 分钟。
6. 小心地把上清液吸至另一新的 1.5ml 离心管中。注意确保不要打散沉淀团或把组织碎片也一起转移。
7. 加入 4 μ l RNase A,涡旋混匀。常温放置 2min。
8. 加入等体积的缓冲液 IB (请确保已经按照标签加入异丙醇),充分混匀。如:向 300 μ l 上清中加入 300 μ l 缓冲液 IB。
9. 把上述混匀的液体转移到吸附柱 CG 上。10,000 \times g 离心 1 min 以结合 DNA,弃去滤出液体。纯化柱最大容量为 750 μ l,如果混合液大于 750 μ l,请分两次过柱。
10. 将吸附柱重新套回收集管中,加入 500 μ l 缓冲液 WB (请确保已经按照标签加入无水乙醇)至柱子中,10,000 \times g 离心 1min,倒弃流出液;
11. 将吸附柱重新套回收集管中,加入 600 μ l DNA Wash Buffer (请确保已经按照标签加入无水乙醇)至柱子中,10,000 \times g 离心 1min,倒弃流出液;
注意: DNA Wash Buffer 使用前须按要求用无水乙醇稀释。如果放入冰箱中,使用前须恢复到室温。
12. 再加入 600 μ l DNA Wash Buffer (请确保已经按照标签加入无水乙醇)至柱子中,8,000 \times g 离心 1min,弃去流出液;
13. 将吸附柱重新套回 2ml 收集管中,最大转速(>13000 \times g)离心空结合柱 1min 以干燥柱子的基质;这一步对下面的洗脱步骤至关重要。
14. 将柱子置于 1.5 ml 灭菌离心管,加入 50-150 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的洗脱缓冲液 EB 至柱子的膜中央。常温静置 5 min;
15. 常温下,离心(>13000g)1min,以洗脱 DNA。保留含 DNA 的流出液。将 DNA 储于-20 $^{\circ}$ C。

● DNA 浓度及纯度检测:

基因组 DNA 片段的大小与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。提取的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。可配制 0.8-1.0% 琼脂糖凝胶,使用 λ /HindIII 判断基因组的大小,完整的基因组大小应在 23 kb 以上。使用分光光度计检测时, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9 之间,如果洗脱时不使用洗脱缓冲液,而使用去离子水洗脱,比值可能偏低,但并不表明 DNA 纯度不高。

常见问题	可能原因	建议
堵柱子	转移裂解上清时,转移了沉淀	按说明书操作,缓冲液 LF 分离后,确保不转移到沉淀

	样品太粘稠	样品量别超过说明书上所说的，或者增加缓冲液 IB 的用量。
低浓度的 DNA 量	样品的破壁方式不对	不论新鲜还是干燥样品，在加入缓冲液 IL 之前必须用适当方式的研磨成粉末。
	样品的裂解效果不好	减少样品量，或者增加缓冲液 IL 的用量。
	DNA 残留在柱子上	增加洗脱液 EB 的用量，并在离心洗脱前将洗脱液 EB 65°C 孵育 5min。
	DNA 洗涤不当	DNA Wash Buffer 按说明书用无水乙醇稀释。
下游应用不好	提取的 DNA 含盐量高	DNA Wash Buffer 必须按要求用无水乙醇稀释，必须常温放置。
	提取的 DNA 含有乙醇	洗脱前，必须最高转速空甩柱子 1 min。