**细胞和组织DNA核酸免提取试剂盒**

**试剂盒应用**

本试剂盒针对哺乳动物细胞、组织开发的专用裂解液DC，在10分钟内完成细胞和组织的裂解、提取和纯化。使用高效硅基DNA纯化柱，高效结合基因组DNA，从而获得纯度高，产量高的基因组DNA。提取的基因组DNA完整性高，适合PCR、qPCR、酶切、Southern杂交、文库构建、克隆等。

本试剂盒仅供研究使用，不可用于临床、食品、化妆品等领域。

**试剂盒组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **Col-D0101（50T）** | **编号** |
| 裂解液DC | 35 mL | Col-D0101A |
| 洗涤液DCW1 | 25 mL | Col-D0101B |
| 洗涤液DCW2 | 12 mL | Col-D0101C |
| 洗脱液C | 5 mL |  |
| DNA纯化柱 | 50套 | Col-D0101E |

**备注：第一次使用前，在洗涤液DCW2中加入48mL无水乙醇，并标记“√”和时间，避免重复加入。**

**保存条件**

室温保存一年。

**自备材料**

水浴锅或金属浴、无水乙醇、无DNase和无RNase离心管、RNaseA（10mg/mL，或货号QR0101）

**使用方法**

1. **样本处理**

**1.1 从动物组织中提取DNA**

1.1.1 取20-100mg样本放入液氮中充分研磨，加入700μL裂解液DC，充分混匀，室温作用1分钟。

或取20-100mg样本加入700μL裂解液DC，加入1颗钢珠，放入组织研磨器中，研磨1-2分钟。

**备注：不同样本中RNA含量差异很大，过多使用样本容易导致堵塞，最终导致RNA提取量下降。**1.1.2 55℃孵育1分钟。

1.1.3 12,000rpm离心1分钟。取500μL上清。

1.1.4 （选做）加入5μL RNase A（10mg/mL），室温静置5-10分钟。

1.1.5 加入250μL无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.2 从悬浮细胞中提取DNA**

1.2.1 细胞1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.2.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液DC。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液DC。轻轻吹打混匀，55℃孵育1分钟。

1.2.3 12,000rpm离心1分钟。

1.2.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.2.5（选做）加入5μL RNase A（10mg/mL），室温静置5-10分钟。

1.2.6 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

**1.3 从贴壁细胞中提取DNA**

1.3.1 胰酶消化细胞后1,000rpm离心5分钟，收集细胞沉淀。

1.3.2 细胞数量<5×106个时，加入500μL裂解液DC。细胞数量为5×106~1×107个时，加入700μL裂解液C。轻轻吹打混匀，55℃孵育1分钟。

1.3.3 12,000rpm离心1分钟。

1.3.4 细胞数量<5×106个时，取450μL上清。细胞数量为5×106~1×107个时，取650μL上清。

1.3.5 （选做）加入5μL RNase A（10mg/mL），室温静置5-10分钟。

1.3.6 加入0.5倍体积无水乙醇，充分混匀。按照步骤2.1-2.7操作。

1. **DNA纯化**

2.1 全部转移到DNA纯化柱中，12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中废液。

2.2 向DNA纯化柱中加入500μL洗涤液DCW1，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.3 向DNA纯化柱中加入500μL洗涤液DCW2，12,000rpm离心30秒，倒掉收集管中废液。

2.4 重复步骤2.3一次。

2.5 12,000rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。

2.6 将DNA纯化柱放入新无DNase和无RNase离心管，加入30-50μL 洗脱液C，室温放置1分钟。

2.7 12,000rpm离心2分钟，得到DNA溶液，-80℃保存。

**注意事项**

1. 经常更换手套，防止DNA污染。
2. 使用无DNase无RNase的吸头和离心管，防止DNA降解。
3. 常更换吸头，防止交叉污染。
4. 动作轻柔，防止基因组DNA断裂。
5. 为了提高洗脱效率，可提前将洗脱液C置于65℃水浴后再使用。