

【产品概述】

BEasy™ 通用型全血/组织/细菌 DNA 提取试剂盒 (柱式法) 适用于从血液、细胞、动物、植物组织、鼠尾、大肠杆菌等多种样本中快速提取基因组 DNA。精心优化的裂解缓冲体系配合高效核酸纯化柱, 通过裂解、结合、快速漂洗等步骤, 可以最大限度的去除蛋白及其他抑制性杂质, 获得高质量 DNA 用于 PCR 扩增、qPCR 分析、NGS 建库、酶切和杂交等下游实验。提取过程简单快速, 无需酚、氯仿等有毒试剂, 也无需进行耗时的醇类沉淀, 针对血液、细胞等样品一般可在 30 分钟内完成提取操作。

【产品组分】

| 组 分 | M1MD01-01 (50 preps) | M1MD01-02 (200 preps) |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Buffer EQ | 5 mL | 20 mL |
| Buffer TL | 11 mL | 40 mL |
| Buffer CB | 15 mL | 60 mL |
| Buffer IR | 25 mL | 100 mL |
| DNA Wash Buffer* | 13 mL | 50 mL |
| Elution Buffer | 15 mL | 20 mL |
| Proteinase K | 1 mL | 4 × 1 mL |
| Spin Column and Collection Tube | 50 套 | 200 套 |

* 首次使用前在 DNA Wash Buffer 中加入 52 mL (50 preps) 或 200 mL (200 preps) 无水乙醇

【运输与储存】

试剂盒常温运输; 收到后将 Proteinase K 置于 4°C 或 -20°C 保存, 其他组分室温 (15~25°C) 保存。
产品有效期 1 年。

【注意事项】

- Buffer TL、Buffer CB 及 Buffer IR 低温时可能析出沉淀, 在 37°C 水浴溶解至恢复澄清透明, 充分混匀后冷却到室温使用。
- 各溶液使用后应及时盖紧盖子, 避免试剂长时间暴露于空气中导致挥发、氧化及 pH 值变化等。
- Spin Column 长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。经 Buffer EQ 预处理可以提高其核酸结合能力, 进而提高基因组 DNA 得率。
- Buffer EQ 是强碱性溶液, 用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。若不慎接触皮肤, 请用大量自来水清洗。
- 所有离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的台式离心机。



【自备试剂和仪器】

无水乙醇、异丙醇、1× PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲液, 根据需要)、RNase A (根据需要)、溶菌酶 (用于革兰氏阳性菌, 根据需要)。

离心机、水浴锅或金属浴、1.5 mL 无核酶离心管、移液器及吸头等。

【操作步骤】

1. 吸附柱平衡处理: 将 Spin Column 放入 Collection Tube, 加入 100 μ L Buffer EQ, 13000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将 Spin Column 重新放回 Collection Tube。注意: 仅在使用前用进行平衡处理。
2. 样本处理:

2.1 全血

- a) 在 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 新鲜或冷冻的抗凝血。如果血液起始量小于 200 μ L, 则用 1 × PBS 补足到 200 μ L。如果起始量介于 200~300 μ L 之间, 则后续操作需按比例增加试剂用量。如果起始量介于 300 μ L~1 mL 之间, 则需要先进行红细胞裂解操作。

【注意】: 如果样本为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液, 其红细胞为有核细胞, 因此处理量仅需 5~20 μ L, 可加 1 × PBS 补足到 200 μ L 后进行后续步骤。

- b) 加入 20 μ L Proteinase K, 充分涡旋混匀。
- c) 【可选 (一般不需要)】: 若想得到无 RNA 的基因组 DNA, 或者处理的是富含 RNA 的样本, 加入 5 μ L RNase A (100 mg/mL, 自备), 涡旋混匀, 室温孵育 5~10 min。
- d) 加入 200 μ L Buffer CB, 立刻涡旋混匀, 70°C 孵育 10 min, 溶液应变清亮 (颜色可能较深)。
- e) 溶液冷却后加入 100 μ L 异丙醇 (也可以用无水乙醇替代, 以下同), 立刻涡旋混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。注意: 加入醇后立刻涡旋或者吹打混匀非常重要, 混匀不充分可能严重降低 DNA 得率。
- f) 转移上一步的混合物 (包括可能出现的沉淀) 至平衡处理后的 Spin Column, 连同 Collection Tube 一起 13,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将 Spin Column 放回 Collection Tube。
- g) 转步骤 3, 继续进行后续纯化操作。

2.2 培养细胞

- a) 收集约 10^5 ~ 10^6 悬浮细胞到 1.5 mL 离心管中; 若为贴壁细胞, 应先用胰蛋白酶消化后再进行收集。
- b) 室温 13,000 rpm 离心 10 sec 沉淀细胞, 吸弃上清, 留下细胞团。
- c) 加入 200 μ L 1× PBS 重悬、洗涤细胞, 13,000 rpm 离心 10 sec 沉淀细胞。完全吸弃上清, 将细胞重悬于 180 μ L 1× PBS 中。
- d) 加入 20 μ L Proteinase K, 充分混匀。
- e) 【可选】若想得到无 RNA 的基因组 DNA, 加入 5 μ L RNase A (100 mg/mL, 自备), 涡旋混匀, 室温孵育 5~10 min。
- f) 再加入 200 μ L Buffer CB, 立刻涡旋混匀, 70°C 孵育 10 min。



- g) 溶液冷却后加入 **100 μ L 异丙醇**，立刻涡旋混匀，此时可能会出现絮状沉淀。注意：加入醇后立刻涡旋或者吹打混匀非常重要，混匀不充分可能严重降低 DNA 得率。
- h) 转移上一步的混合物（包括可能出现的沉淀）至平衡处理后的 **Spin Column**，连同 Collection Tube 一起 13,000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。
- i) 转步骤 3，继续进行后续纯化操作。

2.3 动植物组织（例如鼠肝、鼠脑或植物叶片）

- a) 将 20~50 mg 新鲜或者解冻的动物组织或 50~100 mg 植物组织用解剖刀切成小块（尽量切碎可提高 DNA 得率），或在液氮中研磨成细粉，转入装有 **180 μ L Buffer TL** 的 1.5 mL 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。
- b) 加入 **20 μ L Proteinase K**，立即充分涡旋混匀，55°C 孵育 1~3 小时或直至组织消化完全。孵育期间轻柔振荡混匀数次。
- c) 【可选】若想得到无 RNA 的基因组 DNA，孵育完成后，加入 5 μ L RNase A（100 mg/mL，自备）溶液，振荡混匀，室温孵育 5~10 min。
- d) 加入 **200 μ L Buffer CB**，立即充分涡旋混匀，70°C 孵育 10 min。
- e) 溶液冷却后加入 **100 μ L 异丙醇**，立刻涡旋混匀，此时可能会出现絮状沉淀。注意：加入醇后立刻涡旋或者吹打混匀非常重要，混匀不充分可能严重降低 DNA 得率。
- f) 转移上一步的混合物（包括可能出现的沉淀）至平衡处理后的 **Spin Column**，连同 Collection Tube 一起 13,000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。注意：若有较多未充分消化的动物组织等，转移过程可能会堵住吸头，此时可将吸头在吸水纸上轻蹭去除不溶物，以免未消化组织堵塞 Spin Column。
- g) 转步骤 3，继续进行后续纯化操作。

2.4 动物组织（鼠尾）

- a) 将 0.2~0.5 cm 鼠尾尖（约 20~50 mg；必须是 0~2 cm 范围内的尾尖，否则裂解效果不佳）剪碎，或者在液氮中研磨成细粉，转入装有 **180 μ L Buffer TL** 的 1.5 mL 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。
- b) 加入 **20 μ L Proteinase K**，立刻涡旋混匀；55°C 孵育 1~3 小时或直至组织消化完全，孵育期间轻柔振荡数次，也可以用剪去尖端的大口径吸头吸打裂解物 2~3 次帮助裂解。
- c) 【可选】如果需要得到无 RNA 的基因组 DNA，孵育完成后，加入 5 μ L RNase A（100 mg/mL，自备）溶液，振荡混匀，室温放置 5~10 min。
- d) 加入 **200 μ L Buffer CB** 和 **100 μ L 异丙醇**，立刻涡旋混匀。注意：加入醇后立刻涡旋或者吹打混匀非常重要，混匀不充分可能严重降低 DNA 得率。
- e) 13,000 rpm 离心 5 min，转移上清至平衡处理后的 **Spin Column**，连同 Collection Tube 一起 13,000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。
- f) 转步骤 3，继续进行后续纯化操作。



2.5 细菌

- a) 取 0.5~2 mL 菌液（最多不超过 2×10^9 个细胞），10,000 rpm 离心 30 sec，尽可能吸弃上清，收集菌体。起始处理量可以根据细菌密度、菌株种类、预期得率进行调整。Spin Column 的最大 DNA 载量为 30 μg ，如果菌体过量可能会显著降低 DNA 得率。
- b) 加入 200 μL 1 \times PBS 重悬细胞，10,000 rpm 离心 30 sec，弃上清。加入 180 μL 1 \times PBS，充分振荡或吹打混匀，重悬细胞。
注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可略过上述 b) 步骤，直接使用溶菌酶（自备）进行破壁处理。具体方法为：使用 180 μL 含 20 mg/mL 溶菌酶的缓冲液（20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM Na₂-EDTA; 1.2% Triton X-100，使用前加入终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶（自备），涡旋混匀；直接将溶菌酶干粉溶解在该缓冲液中，否则可能会导致溶菌酶无活性），充分重悬细胞，37°C 孵育 30 min 以上。
- c) 加入 20 μL Proteinase K，充分混匀；
- d) 【可选】如果需要得到无 RNA 的基因组 DNA，加入 5 μL RNase A（100 mg/mL，自备），振荡混匀后室温孵育 5~10 min。
- e) 加入 200 μL Buffer CB，立刻涡旋混匀，70°C 孵育 10 min。
- f) 溶液冷却后加入 100 μL 异丙醇，立刻涡旋混匀，此时可能会出现絮状沉淀。注意：加入醇后立刻涡旋或者吹打混匀非常重要，混匀不充分可能严重降低 DNA 得率。
- g) 转移上一步的混合物（包括可能出现的沉淀）至平衡处理后的 Spin Column，连同 Collection Tube 一起 13,000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。
- h) 转步骤 3，继续进行后续纯化操作。

【纯化步骤】

3. 加入 500 μL Buffer IR，13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。
4. 加入 600 μL DNA Wash Buffer（确保已按要求加入指定体积的无水乙醇），13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将 Spin Column 放回 Collection Tube。
5. 重复上一步，再次使用 600 μL DNA Wash Buffer 进行洗涤。
6. 将 Spin Column 放回 Collection Tube 中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量去除漂洗液，以免残留的漂洗液影响 DNA 纯度及下游应用。
7. 将 Spin Column 放入新的 1.5 mL 无核酶离心管（自备）中，在吸附膜中央加入 100 μL Elution Buffer，室温放置 3~5 min，13,000 rpm 离心 1 min，获得的 DNA 溶液可以直接用于下游反应或置于 -20°C 保存。如果需要长时间存放，建议 -70°C 保存。
注意：预热 Elution Buffer 到 60~70°C 可以提高 DNA 得率。将洗脱的 DNA 溶液重新加入 Spin Column，室温孵育 2 min，再次 13,000 rpm 离心 1 min 收集 DNA 溶液，可在一定程度上提高 DNA 得率。
注意：洗脱体积越大，洗脱效率越高，DNA 得率越高，但浓度会相对降低。如果需要较高的 DNA 浓度，可以适当减少洗脱体积；但最小不应少于 50 μL ，否则洗脱效率降低，可能导致 DNA 得率明显降低。

4

