

基因组 DNA 的提取

基因组提取是常规的实验室操作, 本 Protocol 参照聚合美的基因组提取试剂盒 M5 HiPer Universal DNA Mini Kit 超强通用型 DNA 提取试剂盒

1. 提前打开 56°C 水浴锅, 准备无水乙醇
2. 细胞样品准备: 提前培养扩增细胞到 10 cm 皿, 胰酶消化收取 5×10^6 个细胞, 2000 rpm (400xg) 离心 5 分钟, 弃尽上清, 加 200 μ L GTL, 振荡至样品彻底悬浮
3. 基因组的提取需要去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 μ L 浓度为 100mg/mL 的 RNase A 溶液 (4°C 冰箱中保存), 涡旋 15 秒, 室温放置 2 分钟
4. 加入 20 μ L Proteinase K 溶液, 混匀
5. 加入 200 μ L Buffer GL, 立即涡旋振荡, 充分混匀, 56°C 水浴 10 分钟
6. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入 200 μ L 无水乙醇, 立即涡旋振荡, 充分混匀, 短暂离心
 - ! 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。一些组织在加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能形成溶胶状产物, 此时可进行剧烈震荡或涡旋处理
7. 上一个步骤中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12000 rpm (约 13400 g) 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中
8. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中
9. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中
 - 注意: 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复该步骤
10. 12000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干
 - 注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)
11. 将吸附柱置于一个新的离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 50-200 μ L 65°C 预热的 Buffer GE 或灭菌水, 室温放置 2-5 分钟, 12000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20°C 保存 DNA
 - ! 浓度不理想时可以重复洗脱一次柱子

修订日期 2024-04-23

JWangL5