

乙醇固定样品 DNA 抽提和直接 PCR

在实际的研究工作中，野外取样的地点一旦较为偏远，受条件的限制，很难保证得到的样品活体或能够快速冷冻；另外，对一些稀有物种和濒危种，鲜活样品的采集十分困难，一般为了解决这些问题，常采用乙醇和甲醛固定的方法来处理样品，再对样品 DNA 进行提取以及扩增。使用乙醇固定样品具有硬化，固定，脱水作用，对组织渗透迅速，特别适合组织中核酸的保存，相比于甲醛等其它固定方法，此法更简单，保存时间更长质量更好，也更加清洁无害。乙醇固定样品主要应用于水产种质资源鉴定，医院或兽医病理样品保存，法医样品保存等方面，在特定物种基因保护，生物多样性，动物分子标记，司法鉴定等方面有广泛的应用。

Omega Bio-Tek 相应试剂盒既能够快速有效的抽提得到乙醇保存多年的样品基因组 DNA，又可以利用直接 PCR 系统，快速的对乙醇保存样品进行 PCR 鉴定，为您的研究提供最有力的工具。

一、材料：乙醇浸泡的鱼苗

二、方法：

方案一：E.Z.N.A. Tissue Direct PCR kit

1. 分别取 45ul AT1 和 5ul AT2 到 0.2ml PCR 管中，混合均匀。对于有较多样品需要操作的，可以先将 AT1 和 AT2 用量计算好，混合均匀后再分装到每一管中。
2. 取鱼苗一条，在 AT4 中浸泡约 5-10min，滤纸吸干水份。
3. 将鱼苗浸没在上一步准备的 AT1 中 56℃水浴或者 PCR 仪上消化 10-20min，中间可以涡旋混匀一次。
4. 消化完后的 PCR 管置于 90℃水浴或者 PCR 仪上 5min，稍微冷却后加入 50ul AT3 涡旋混匀。
5. 以上裂解液就可以作为 PCR 的模板直接使用，PCR 体系中建议加入 5ul 左右。
6. 取 5ul E.Z.N.A. Tissue Direct PCR kit 抽提得到的一条鱼苗的 DNA 作为模板，客户提供的引物 Y-30-R/F 作为引物，PCR 扩增

PCR 扩增程序：

94℃ 2min;
94℃ 30S 52℃ 30S 72℃ 40S 33cycles;
72℃ 5min;
25℃ forever .

方案二：E.Z.N.A.® MicroElute® Genomic DNA Kit

- 1、称量 10mg 组织，加入 200ul Buffer TL
- 2、加 20ul OB, 55℃孵化至完全降解
- 3、13,000xg 离心 2min，转移上清至新管
- 4、加 220ul Buffer BL 涡旋混匀，70℃孵化 10min
- 5、加 220ul 无水乙醇，最大速度涡旋 15s
- 6、将混合液过柱吸附，13,000xg 离心 30-60s，弃滤液
- 7、加 500ul Buffer HB，离心
- 8、700ul DNA Wash Buffer（加乙醇）
- 10、13,000xg 离心 2min，干燥柱子
- 11、加 25ul 70℃预热的 Elution Buffer 洗脱

三、结果：

①、方案一：

取 6ul PCR 产物，1.5%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色后拍照所得结果如下。

S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 C1 C2 M



S1-9: 九条不同的鱼苗样品

C1: 空白对照

C2: 10mg 乙醇浸泡的鱼苗使用 E.Z.N.A. SQ Tissue DNA kit 抽提 DNA 后作为模板 PCR 所得到的结果

M: DL2000

②方案二、

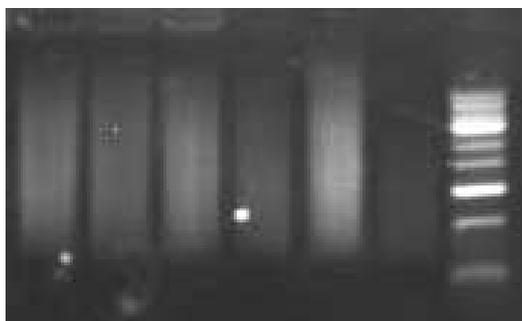
1. OD 值

Sample ID	Nucleic Acid Conc.(µg/µl)	A260	A280	260/280	260/230
S1	0.0506	1.011	0.551	1.83	1.72
S2	0.053	1.06	0.579	1.83	1.74
S3	0.0561	1.123	0.603	1.86	1.78
S4	0.0399	0.798	0.418	1.91	1.63
S5	0.0739	1.478	0.793	1.86	1.86
S6	0.022	0.44	0.216	2.04	1.68

注：OD 仪为 nano drop2000c 取 2ul 测定 OD 值

2.DNA 电泳

S1 S2 S3 S4 S5 S6 M



洗脱体积：25ul Elution buffer ; 上样量：15ul

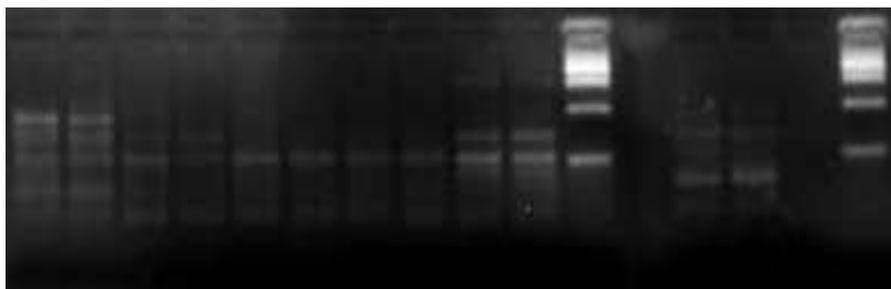
S1-6： 六条不同的乙醇浸泡过的鱼苗经过 E.Z.N.A. Microelute Genomic DNA kit 抽提得到的 DNA 电泳图

M： CL5000

3. 取 5ul E.Z.N.A. Microelute Genomic DNA kit 纯化的 DNA 作为 PCR 反应的模板，客户提供的引物 Y-30-R/F 作为引物，PCR 扩增，

取 8ul PCR 产物，3%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色后拍照所得结果如下。

S1 S2 S3 S4 S5 M S6 CK M



S1-6： 六条不同的鱼苗经 E.Z.N.A. Microelute Genomic DNA kit 抽提得到的 DNA 作为模板进行 PCR 所得结果

M： DL2000

CK： 空白对照（用灭菌双蒸水作为模板）