

磁珠法提取乙醇固定样品 DNA

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、样品：乙醇固定四年的小鱼；乙醇固定的毛蚝组织 样品预处理：

- 1) 用镊子将乙醇固定样品从乙醇中取出，吸水纸轻轻吸干乙醇后将样品放在 AT4 中浸泡 10 分钟；
- 2) 用吸水纸轻轻吸干样品的 AT4 后将样品剪碎，称取 2mg-10mg 样品量加入 180ul TL Buffer 和 20ul Proteinase K 混匀，55℃ 水浴消化 1-3hours 至物呈颗粒状样品为止，期间混匀 3-4 次；
- 3) 加入 5ul RNase A 室温放置 15-20 分钟，期间混匀 3 次。

以下步骤用 Thermo scientific 公司的 KINGFISHER FLEX 自动化仪器操作，详细步骤及程序见附注。

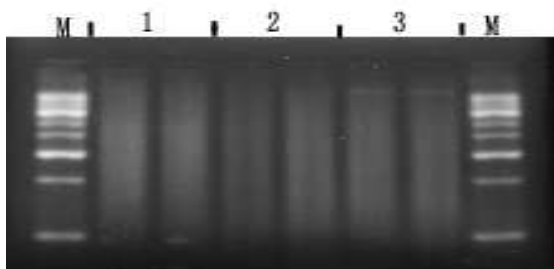
二、结果：

1) 样品：2mg 乙醇固定四年的小鱼

①、OD 值：Nanodrow 2000 analysis

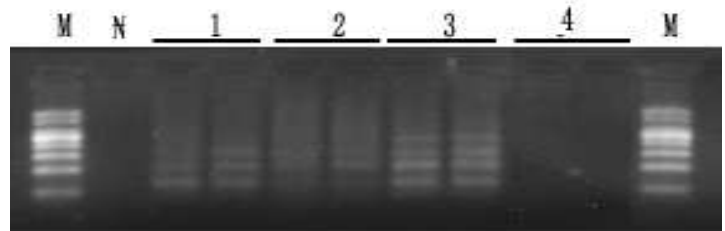
Sample ID	Conc. (µg/µl)	A260	A280	260/280	260/230	产量(ug)
1	0.1372	2.743	1.473	1.86	2.04	12.348
	0.1485	2.969	1.604	1.85	2.03	13.365
2	0.2801	5.602	3.215	1.74	1.66	14.005
	0.2678	5.357	3.05	1.76	1.68	13.39
3	0.3026	6.052	3.705	1.63	0.4	15.13
	0.284	5.679	3.406	1.67	0.59	14.2
阴性对照	0.0455	0.911	0.62	1.47	1.11	2.275
	0.0438	0.875	0.596	1.47	0.84	2.19

②、Genomic Analysis



1-3: 为三种 2mg 乙醇固定四年的小鱼其 DNA 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图
M: CL5000 Marker

③、PCR Analysis



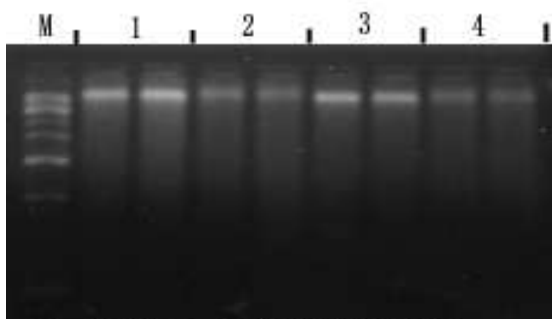
取 10% DNA 产物，经 SSR 引物 PCR 50ul 体系扩增 36 个循环，取 20% 于 3% 琼脂糖凝胶电泳图。
1-3: 为三种 2mg 乙醇固定四年的小鱼样品 PCR 产物
4: 样品阴性对照
N: PCR 负对照
M: 50bp Marker

2)样品：10mg 乙醇固定的毛蚝组织

①、Nanodrow 2000 analysis

Sample ID	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A260	A280	260/280	260/230	产量/ μg
1	0.1443	2.885	1.518	1.9	1.52	11.544
	0.1488	2.976	1.578	1.89	1.56	11.904
2	0.1519	3.038	1.619	1.88	1.52	12.152
	0.1463	2.925	1.548	1.89	1.52	11.704
3	0.2712	5.424	2.861	1.9	1.72	21.696
	0.2501	5.002	2.63	1.9	1.49	20.008
4	0.2959	5.919	2.997	1.97	1.98	23.672
	0.2939	5.877	2.988	1.97	1.95	23.512

②、Genomic Analysis



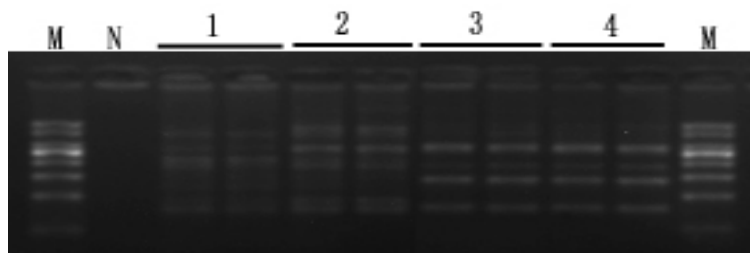
1-4: 为四种10mg乙醇固定的生蚝组织
其DNA于1.5%琼脂糖凝胶电泳图
M: CL5000 Marker

附注:

1、加样:

- 1) Plate 1: 200ul 样品消化液+500ul lysis buffer 3;
- 2) Plate 2: 700ul PHB Buffer;
- 3) Plate 3: 700ul PHB Buffer;
- 4) Plate 4: 700ul 70% Ethanol;
- 5) Plate 5: 700ul 70% Ethanol;
- 6) Plate 6: 50-80ul Elution Buffer
- 7) Plate 7: for tip

③、PCR Analysis



取5ul DNA产物为模板, 用SSR引物
以50ul体系PCR扩增36个循环;
取20%于3%琼脂糖凝胶电泳
1-4: 四种10mg乙醇固定生蚝组织PCR产物
N: 负对照
M: 50bp Marker

2、KINGFISHER FLEX 仪器自动化程序设置:

- 1) Pick-up from: Plate7
- 2) Mix: 中速 2min, 在 Plate 1 操作;
- 3) Pause: 加入 40ul 磁珠, 在 Plate 1 操作;
- 4) Mix: 快速 2min, 中速 2min, 1 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate1 操作;
- 5) Mix: 中速 1min, 1 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate2 操作;
- 6) Mix: 中速 1min, 1 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate3 操作;
- 7) Mix: 中速 1min, 1 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate4 操作;
- 8) Mix: 中速 1min, 1 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate5 操作;
- 9) Dry: 液面上干燥 7min, Plate5 操作;
- 10) Mix: 预热, 加热温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 快速 2min, 中速 2min, 3 个循环, 吸附磁珠, 在 Plate6 操作;
- 11) 最后释放磁珠到 Plate5 中;
- 12) 操作完成, 检测结果.