

血液基因组 DNA 小量提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒采用独特的细胞裂解液Buffer GL, 配合蛋白酶K裂解细胞释放DNA; 加入Buffer GB, 调整DNA结合条件, 硅胶材料选择性吸附DNA。

适合从200 μ l 哺乳动物全血或者血清, 10 μ l 禽类鸟类和两栖类全血中获得多至12 μ g DNA(增加试剂用量, 最多适合从400 μ l 哺乳动物全血中提取DNA)。纯化的基因组DNA长度可达20-30 kb, 适合用于酶切、PCR、Southern杂交、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

不适合处理肝素抗凝的血液, 建议使用DK602或者DK603。

本试剂盒能有效回收>250 bp的DNA片段, 包括降解的基因组DNA, 游离DNA, 线粒体DNA和病毒DNA等。

本试剂盒使用DNA吸附柱-C15回收DNA, 最大吸附量为15 μ g DNA, 最小洗脱体积为15 μ l。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK601-01 (50 次)	DK601-02 (200 次)	原理与用途
Proteinase K*	1 ml	4 \times 1 ml	降解蛋白
Buffer GL	15 ml	60 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer GB	30 ml	120 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 [§]	16 ml	65 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-C15	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	50 个 \times 3	200 个 \times 3	接收废液
1.5 ml 离心管	50 个	200 个	接收洗脱的 DNA
TE ^{**}	15 ml	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

[§]Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

**TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025%NaN₃, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

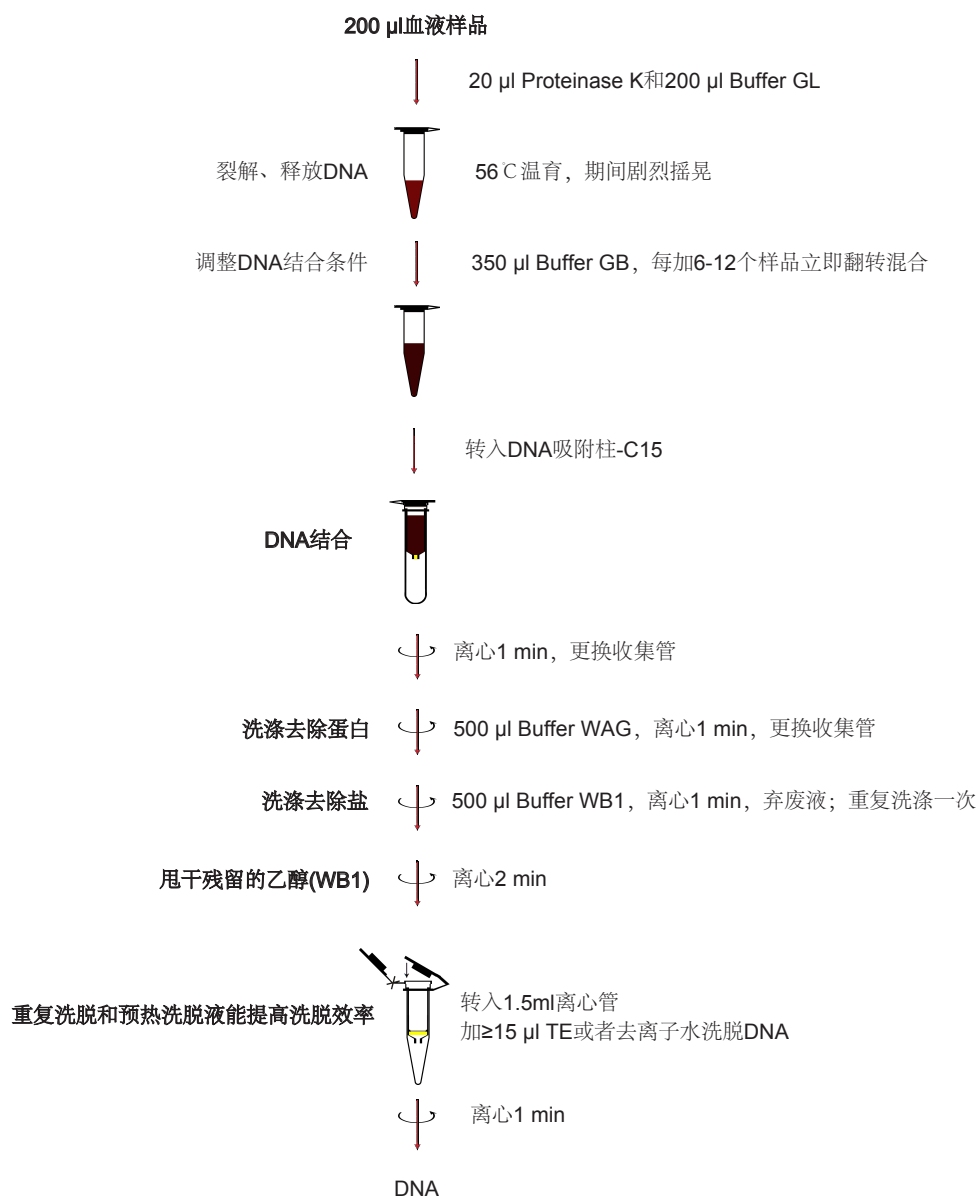
三、注意事项

- 血液样品短期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, 2-8°C可保存 10 天, 基因组 DNA 完整性和产量随放置时间延长而下降。
- 血液样品长期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, -70°C保存。使用时应减少反复冻融, 可在冻存前按所需使用体积分装。
- 冻存血液应在室温或 37°C 缓慢解冻, 不可高温加热, 以免血凝块形成; 将冻存血置于 37°C 摇床中 150-200rpm 融化血液效果最佳, 可减少血凝块的形成。也可以提前一天将血液放在 4°C 解冻, 第二天摇晃均匀后恢复至室温。
如样品中出现血凝块, 大部分 DNA 存在于血凝块中, 应吸取血凝块用作 DNA 提取。
- Buffer GL、Buffer GB 和 Buffer WAG 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
- 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果, 尤其是 Buffer GB、Buffer WAG 和添加乙醇后的 Buffer WB1。
- 操作步骤 1-3, 需准确按比例加入血液材料和试剂, 不然会影响实验效果。
- 操作步骤 2, 此步骤为实验关键步骤, 尤其是处理含有血纤维和血凝块的陈旧血液。如果细胞和血纤维裂解不完全或残留完整的血凝块, 在后续步骤中堵塞 DNA 吸附柱, 降低 DNA 结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响 DNA 的产量和纯度。**
- 操作步骤 3, 批量处理样品时, 每 6-12 个样品加入 Buffer GB 后需立即翻转混合均匀, 不然裂解液与 Buffer GB 界面处有大量蛋白和 DNA 析出, 在后续步骤中堵塞 DNA 吸附柱, 降低 DNA 结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响 DNA 的产量和纯度。**

四、实验准备

- 56°C水浴或温箱; 56°C预热 TE 或去离子水 (pH \geq 7)。
- 56°C预热 Buffer GB 和 Buffer WAG。
- Buffer GL 可能会析出乳白色凝集物, 需 56°C加热溶解或使用前摇晃均匀。
- 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇, 混合均匀。

五、操作流程示意图



六、操作步骤 (★为关键步骤)

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

1. 在干净的 1.5 ml 离心管中加入 200 μl 血液材料(包括抗凝和非抗凝血)

- 哺乳动物全血不足 200 μl 时，用去离子水或者 TE 补足体积至 200 μl。
- 哺乳动物全血超过 200 μl 时，步骤 2-3 按比例增加试剂体积，但血液体积不可超过 400 μl (DNA 吸附柱-C15 不能有效吸附过多的血液中的 DNA)，
例如：400 μl 血液材料 + 40 μl Proteinase K + 400 μl Buffer GL + 700 μl Buffer GB。
- 已分离去除血浆的血液，应估算起始全血体积。
通常 100 μl 去除血浆的血液起始全血体积约 200 μl，按 1.a 操作；
通常 200 μl 去除血浆的血液起始全血体积约 400 μl，操作步骤 2 加入 40 μl Proteinase K 和 200 μl Buffer GL。
- 禽类、鸟类和两栖类等因其血红细胞为有核细胞，每次处理不可超过 10 μl，并且用去离子水或者 TE 稀释至 200 μl。
▲如抗凝血中出现血凝块，大部分 DNA 存在于血凝块中，应吸取血凝块用作 DNA 提取。

2. 加入 20 μl Proteinase K 和 200 μl Buffer GL，Vortex 震荡 10 秒或剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 56℃ 水浴或温箱；温育 4-5 min 后，以同样的方式震荡或者摇晃混合一次，继续温育 4-5 min；延长温育时间可提高 DNA 产量与纯度。

★如血液样品中含血凝块或冻存时间超过 6 个月，温育总时间延长至 20 min，温育期间至少剧烈震荡或摇晃 2 次；批量处理样品建议温育过夜。

▲为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer GL 按照 1:10 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

▲RNA 残留可能会影响酶切但不影响 PCR。如需去除 RNA，可在此步骤加入 8 μl RNase A1 (50 mg/ml) 溶液 (Cat#RE101-02)，混合均匀。

▲此步骤为实验关键步骤，尤其是处理含血纤维和血凝块的陈旧血液。多次剧烈震荡或剧烈摇晃有利于分散血纤维、打散血凝块；延长温育时间有利于降解血纤维使血凝块崩解，充分释放 DNA。

3. 加入 350 μl 56℃ 预热的 Buffer GB，温和翻转离心管 10 次混合均匀；如样品中含血凝块，需要翻转离心管 30 次。

★批量处理样品时，每 6-12 个样品加入 Buffer GB 后需立即翻转混合均匀。不然，裂解液与 Buffer GB 界面处会有大量蛋白和 DNA 析出，影响后续纯化步骤，最终影响 DNA 的产量和纯度。

4. 将步骤 3 的溶液转入 DNA 吸附柱-C15(置于收集管)；离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 转入另一个干净的收集管。

DNA 吸附柱-C15 最大柱体积为 900 μl，如溶液体积 > 900 μl 应分次过柱；

如过柱体积 > 800 μl，离心后 DNA 吸附柱-C15 底部会接触滤液，溶液不能完全滤过，需倒弃滤液后再次离心。

5. 加入 500 μl 56℃ 预热的 Buffer WAG，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C15 转入另一个干净的收集管。

6. 加入 500 μl Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C15 放回收集管。

7. 重复步骤 6。

8. 离心 2 min。

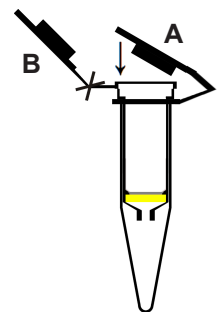
9. 将 DNA 吸附柱-C15 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 ≥15 μl TE 或去离子水 (pH ≥ 7.0)，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。

室温放置 1-2min 或更长时间，离心 1 min。

▲ 56℃ 预热 TE 或去离子水 (pH ≥ 7.0)，可以提高洗脱效率。

▲ 如使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0。

▲ 离心结束后再加入 ≥ 15 μl TE 或者去离子水，重复此步骤，可以提高洗脱效率 (见实验示例 2)。



七、实验示例

实验示例 1: 使用 DK601 从不同保存条件的血液中提取 DNA

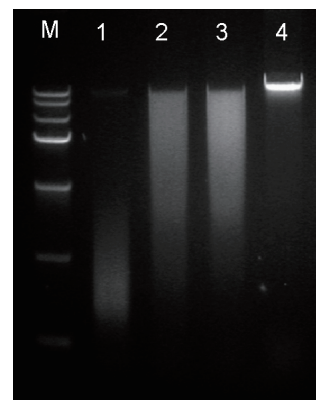
样品: 200 μl 猪血

洗脱体积 100 μl，取 2 μl 电泳；0.8% 琼脂糖凝胶，电压 4V/cm，电泳 30 min；M: DL15,000

- 猪血 -20℃ 冻存约 8 个月后解冻，4℃ 放置 4 周；大部分 DNA 已降解为 250bp-2,500bp 片段；
- 猪血 -20℃ 冻存约 8 个月后解冻，4℃ 放置 2 周；大部分 DNA 已降解为 500bp-10,000bp 片段；
- 猪血 -20℃ 冻存约 9 个月后解冻，4℃ 放置 1 周；大部分 DNA 已降解为 1,000bp-10,000bp 片段；
- 猪血 -20℃ 冻存约 9 个月后解冻，4℃ 放置 1 天；大部分 DNA ≥ 15,000bp。

本试剂盒可从血液中提取 > 250 bp DNA，DNA 产量和完整性与血液储存条件和时间有关。

冻存血在解冻后，由于细胞损伤或者破裂加速了 DNA 降解；建议在短时间内进行 DNA 提取。



实验示例 2: 重复洗脱能提高洗脱效率

使用 DK601 从 3 份正常人血液(200 μ l 抗凝血, -20°C 保存 6 个月)中提取 DNA, 50 μ l TE 洗脱 2 次, 洗脱总体积 100 μ l。

第一次洗脱						
Sample ID	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	concentration(ng/ μ l)
1	2.446	1.274	1.197	1.92	2.04	122.2
2	3.982	2.146	1.888	1.86	2.11	199.1
3	3.009	1.622	1.344	1.86	2.24	150.4
第二次洗脱						
Sample ID	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	concentration(ng/ μ l)
1	1.37	0.79	0.721	1.73	1.9	68.4
2	1.203	0.677	0.63	1.78	1.91	60.1
3	1.354	0.756	0.609	1.79	2.22	67.6
Sample ID	洗脱总体积(μ l)	DNA 总量(μ g)	浓度(ng/ μ l)			
1	100	9.53	95.3			
2	100	12.96	129.6			
3	100	10.9	109			

八、常见问题解答

Q1 为什么本试剂盒(DK601)不适合处理肝素抗凝的血液?

A1 肝素是高度带负电荷的酸性黏多糖, 在硅胶材料吸附 DNA 的条件下, 也能结合到硅胶材料上; 在最后洗脱时能与 DNA 一起洗脱下来。肝素会抑制 PCR 和酶切等大部分酶反应。建议使用 DK602 或 DK603。

Q2 为什么使用本试剂盒(DK601), 最后获得的 DNA 的长度只有 20-30 kb? 试剂是否会造成 DNA 降解?

A2 本试剂盒(DK601)采用硅胶材料吸附 DNA 的原理回收 DNA。基因组 DNA 为线性长链状 DNA, 能与硅胶材料多点结合, 后续的离心过程中因机械力而发生断裂成为 20-30 kb 的片段; 但可以满足 PCR 等常规的实验。试剂不会造成 DNA 降解, DNA 完整性与血液的保存方法, 保存时间有关(见 page4-3 实验示例 1)。

DK602 采用异丙醇沉淀 DNA 的方法, 长度可达 150 kb(除非提取前已经降解), 尤其适用于酶切和 Southern 杂交。

Q3 提取的 DNA 作为 PCR 模板无 PCR 产物

A3.1 血液样品使用肝素抗凝, 见(Q1);

A3.2 步骤7离心时间不足2 min, 未彻底去除Buffer WB1(含乙醇, 乙醇会抑制PCR);

A4.3 DNA纯度低, 见Q4。

A4.4 血液中滋生大量细菌, 见Q5。

A4.5 PCR体系中加入过多的模板DNA, 详见PCR相关产品说明书。

Q4 DNA 产量低, 而且纯度低

A4.1 操作步骤2未剧烈震荡或者摇晃, 细胞裂解不完全或残留完整的血凝块, 在后续步骤中堵塞DNA吸附柱, 降低DNA结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响DNA的产量和纯度。

A4.2 操作步骤3加入Buffer GB后长未及时翻转混合均匀, 裂解液与Buffer GB界面处有大量蛋白和DNA析出, 在后续步骤中堵塞DNA吸附柱, 降低DNA结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响DNA的产量和纯度。批量处理样品建议每6-12个样品加入Buffer GB后立即翻转混合均匀。

Q5 4 $^{\circ}\text{C}$ 或室温长时间放置的血液能否用于提取 DNA?

A5 血液在4 $^{\circ}\text{C}$ 或室温长时间放置后, 大部分DNA已降解(尤其是冻融后的血液, 见实验示例1), 通常不影响常规PCR检测。

4 $^{\circ}\text{C}$ 或室温长时间的血液可能会滋生大量细菌, 彻底降解血液DNA, 最终获得的DNA是细菌的基因组DNA, 不能用于血液相关的检测。

Q6 260/230 比值很不正常

A6.1 未准确调零。需要用与洗脱 DNA 一致的缓冲液调零, 洗脱液严重污染也可能出现 260/230 比值不正常。洗脱液尽可能分装到 1.5 ml 离心管后再放入水浴锅预热, 管口不可接触液面, 以免水浴锅中的污水污染洗脱液; 建议使用金属浴或者恒温箱预热。

A6.2 盐和蛋白残留, 见 Q4。