

96 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 (能有效裂解血凝块); 加入 Buffer GB, 调整 DNA 结合条件, 释放的 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上。

本试剂盒适合从 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)。获得的基因组 DNA 长度可达 20-30 kb, 无明显的蛋白、盐和乙醇残留, A260/230 \geq 2.0, 适用于于芯片和质谱等后续的实验。

本试剂盒不适合处理肝素抗凝的血液。

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 96 DNA 吸附板-C15 回收 DNA, 完全避免个别孔可能被堵塞的情况, 确保样品提取的均一性。每个孔最大吸附量为 15 μ g DNA, 最小洗脱体积为 25 μ l, 最大洗脱总体积为 140 μ l。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK691-2	原理与用途
Proteinase K*	4 \times 1 ml	降解蛋白
Buffer GL	60 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer GB	120 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	120 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 [§]	65 ml	洗涤去除盐
96 DNA 吸附板-C15	2 块	选择性吸附 DNA
96 深孔板	4 块	接收废液
96 U 型板	2 块	接收洗脱的 DNA
不干胶片	4 张	密封 96 U 型板, 保存 DNA
TE*	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	

如果处理样品体积超过 200 μ l, 需订购 Proteinase K 和 Buffer GL; 如果处理样品体积超过 250 μ l, 还需要订购 96 深孔板。

*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或者95%乙醇, 混合均匀。

*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.25%NaN₃, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

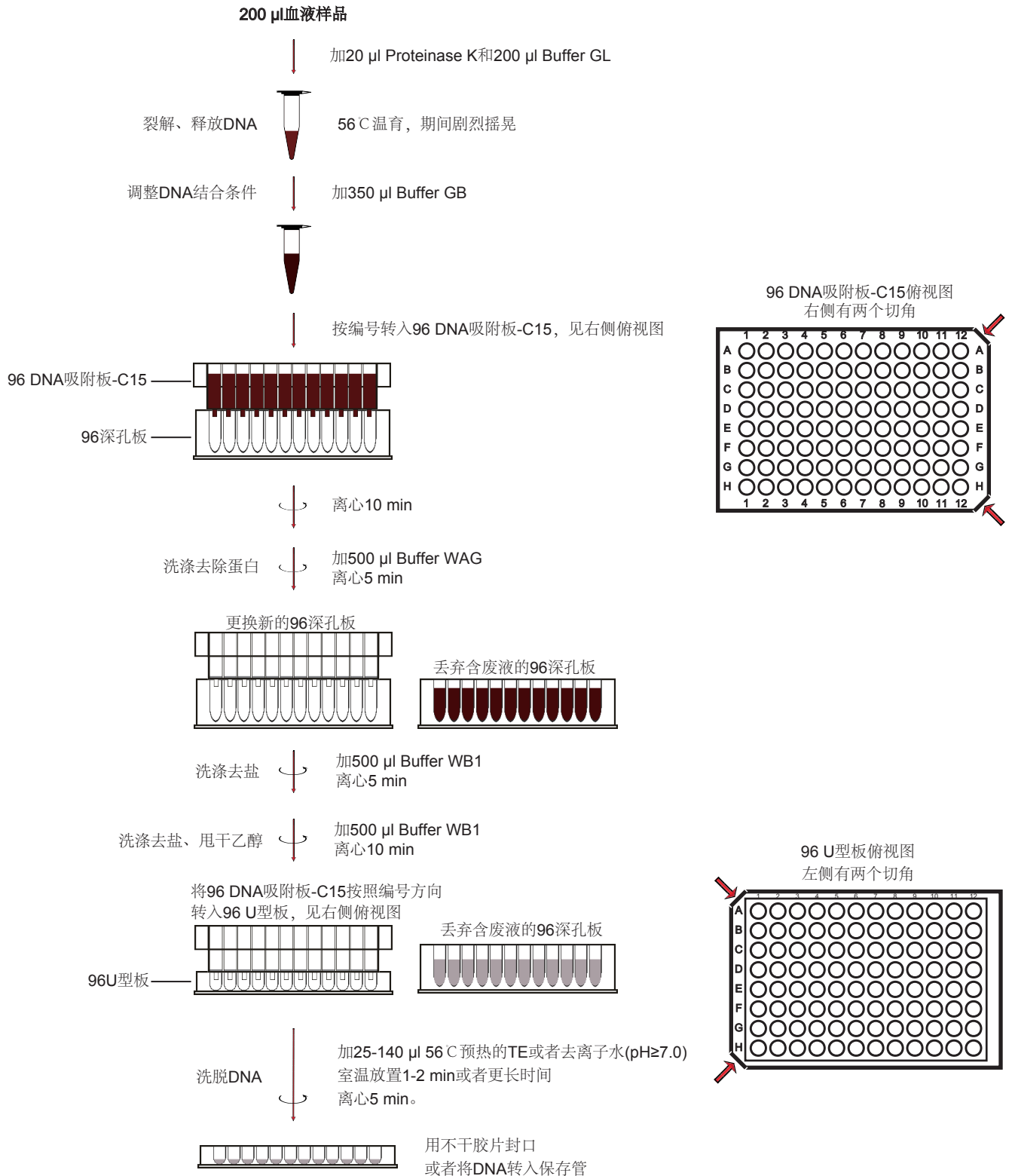
三、注意事项

- 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者 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。
- 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。
- 操作步骤 1-4, 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, 尤其是含有血凝块的血液材料。如果细胞裂解不完全或者有残留的血凝块, 会堆积在 96DNA 吸附板-C15 中的硅胶膜但不影响溶液滤过, 大大降低 DNA 结合和洗脱效率, 并且影响 DNA 纯度。
- 操作步骤 9, 96 DNA 吸附板-C15 按照编号方向转入 96 U 型板, 详见五、操作流程示意图图示。

四、实验准备

1. 56°C水浴或者温箱；56°C预热 TE 或者去离子水 (pH≥7)。
2. 试剂盒储存温度低于 10°C 时，Buffer GL 可能会析出乳白色凝集物，需 56°C以上加热溶解，或者使用前摇晃均匀。
3. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇或者 95%乙醇，混合均匀。

五、操作流程示意图



六、操作步骤

为了避免样品间交叉污染，步骤 1-3 使用单个离心管操作；

为了方便操作，建议步骤 1-3 使用 96 离心管盒操作，步骤 2 使用温箱加热；

所有离心条件为：吊篮式水平转子，室温 2,500×g；如果离心力偏低，不利于溶液滤过，最终获得的 DNA 有明显的蛋白、盐和乙醇残留；如果离心力偏高，塑料耗材可能会变形甚至破裂。计速为 rpm 的离心机，按公式计算所需转速：

$$\text{转速(rpm)} = \frac{15007}{\sqrt{R}} \quad R \text{ 为转子半径, 单位 cm.}$$

如果吊篮式水平转子底部不平整，应在底部垫上合适尺寸、平整的铁板或者塑料板。

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，在步骤 1-3 中按比例增加试剂体积，但血液体积不可超过 400µl（96DNA 吸附板-C15 不能有效吸附过多的血液中的 DNA），例如：40 µl Proteinase K + 400 µl 血液材料 + 400 µl Buffer GL + 700 µl Buffer GB；
- 禽类、鸟类和两栖类等因其红细胞为有核细胞，每次处理不可超过 10µl，并且用去离子水或者 TE 稀释至 200 µl。

2. 加入 **20 µl Proteinase K** 和 **200 µl Buffer GL**，Vortex 震荡 10 s 或者剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 56°C 水浴 10 min 或者 56°C 温箱 15 min；温育期间以同样的方式至少震荡或者摇晃混合一次。如果血液样品是血凝块(或者含有大量血凝块)或者血液样品冻存超过 6 个月，温育时间延长至 30 min 或者更长时间，也可以温育过夜。

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。

▲如果血液材料中含有血凝块，剧烈震荡或者摇晃有利于打散血凝块，加快裂解速度。Buffer GL 为粘稠溶液，可以减少剧烈震荡或者摇晃对 DNA 造成的机械力损伤。

▲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。

3. 加入 **350 µl Buffer GB**，温和翻转离心管 10 次混合均匀(样品是血凝块或者含大量血凝块，需要翻转离心管 30 次)。

4. 将 **96 DNA 吸附板-C15** 置于 **96 深孔板** 上，将步骤 3 中的溶液用移液器按编号转入 **96DNA 吸附板-C15** 对应的孔中。

每个孔加样体积不能超过 1.2 ml，即起始样品体积不超过 300 µl，不然后续离心步骤会出现交叉污染；

如果样品体积为 300-400 µl，应分两次转入 **96 DNA 吸附板-C15**，每次加样体积不超过 1.2 ml；

如果 **96 DNA 吸附板-C15** 上平面沾染溶液，用干净的吸水纸擦干。

5. 将 **96 DNA 吸附板-C15** 连同 **96 深孔板** 放入吊篮式水平转子，离心 10 min。

如果起始样品体积超过 250 µl，将 **96 DNA 吸附板-C15** 转入另外一块干净的 **96 深孔板**(需单独订购)。

6. 在 **96 DNA 吸附板-C15** 每个孔中加入 **500 µl Buffer WAG**，离心 5 min。

7. 将 **96 DNA 吸附板-C15** 转入另外一块干净的 **96 深孔板**，在 **96 DNA 吸附板-C15** 每个孔中加入 **500 µl Buffer WB1**，离心 5 min。

8. 在 **96 DNA 吸附板-C15** 每个孔中加入 **500 µl Buffer WB1**，离心 10 min。

9. 将 **96 DNA 吸附板-C15** 按照编号方向转入 **96 U 型板**。在 **96 DNA 吸附板-C15** 每个孔中加入 25-140 µl 56°C 预热的 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，室温放置 1-2min 或者更长时间，离心 5 min。

加入洗脱液体积为 25-100 µl，需将洗脱液准确加在硅胶膜中央；加入洗脱液体积为 100-140 µl，无需注意加样的位置。

▲56-70°C 预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

▲如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

▲离心结束后再加入≥25 µl TE 或者去离子水洗脱，可以提高洗脱效率。但洗脱总体积不可超过 140 µl，不然 **96 DNA 吸附板-C15** 底部会接触液面。