



无柱式血液基因组 DNA 提取试剂盒

(Blood Genomic DNA Kit)

目录号: ZP313

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP313-1 (可处理 100ml 血液)	ZP313-2 (可处理 200ml 血液)
10×细胞裂解液 L	50ml	2×50 ml
缓冲液 E	60 ml	120 ml
缓冲液 TE	30 ml	60ml
蛋白酶 K	500 μl	1 ml
说明书	1 份	1 份

储存条件:

所有试剂置于室温 (15-25°C) 干燥条件下可保存 12 个月, 保存更长时间可置于 2-8°C。

产品简介:

本试剂盒采用独特的缓冲液系统, 提取0.1ml -20ml加入各种抗凝剂的新鲜血液和冻存血液样品基因组DNA。本缓冲液系统可最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质污染。提取的基因组DNA片段大, 产量高, 纯度好, 稳定可靠。

本试剂盒避免使用苯酚、氯仿等有机溶剂, 回收的 DNA 可适用于各种常规操作, 如酶切、PCR、文库构建、Southern 杂交等实验。

提取得率: (根据血液样品中白细胞数量的不同, DNA 产量有所差异)

材料	保存时间	提取量	DNA 产量	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀
人类全血	4°C一周	1 ml	20-40 μg	1.7 - 1.9
人类全血	4°C一周	5 ml	120-240 μg	1.7 - 1.9
人类全血	4°C一周	10 ml	200-400 μg	1.7 - 1.9

产品特点:

量大质优: 提取 0.1ml-20ml 各种血液, 可获得多达 2-400μg 高纯度 DNA。

安全可靠: 无苯酚、氯仿等有机溶剂的污染。

价廉物美: 与同类产品相较, 性价比高, 纯化得到的 DNA 样品可长期保存。

注意事项:

- 血液样品反复冻融, 会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。所得基因组 DNA 也应尽可能避免反复冻融, 以免断裂。
- 血液样品的储存:
 - 短期保存: 已加入抗凝剂的血液样品可在 2-8°C 储存最多 10 天, 对于某些实验例如 Southern 杂交等, 需要得到完整全长的基因组 DNA, 请将血液样品在 2-8°C 储存不超过 3 天, 此时基因组 DNA 的降解程度较轻。
 - 长期保存: 已加入抗凝剂的血液请置于 -70°C 保存 (如果提取的是高分子量的 DNA, 推荐使用 EDTA 作为抗凝剂)
- 所有离心操作均可在室温下完成。
- 红细胞裂解液为 10×母液, 实验时请用蒸馏水稀释至 1×使用。

一、小体积全血操作流程 (<600 μ l 血样；以 300 μ l 血液处理量为例)

1. 向 300 μ l 抗凝剂的血液中加入 750 μ l 1 \times 红细胞裂解液 L (10 \times 红细胞裂解液 L 需要稀释为 1 \times 使用), 颠倒混匀 5 次。

注意：为方便与离心机配套使用，可加入与血液等体积的细胞裂解液 L，重复裂解两次。

2. 10,000 \times g 离心 20 秒。倒弃上清，将离心管倒置在干净的吸水纸上停留 2 分钟，确保沉淀在管中 (**此步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖底离心管**)。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。

3. 按照表 1 配制缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后 1 小时之内用完。

4. 加入 150 μ l 缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：当处理多个样品时，加入缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液后要立刻涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再涡旋振荡。通常涡旋混匀 5 秒就足以混匀沉淀，但是有可能痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液 (具体补加量见表 1)，再次涡旋混匀。

5. 65 $^{\circ}$ C 水浴 10min，其间颠倒混匀数次。

注意：随着蛋白的消解，溶液的颜色从红色变为黄绿色。

6. 加入 150 μ l 异丙醇，颠倒充分混匀至出现丝状或簇状基因组 DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀 DNA 非常重要，应该仔细观察。对于白细胞数目很少的样品，DNA 沉淀可能看不到，此时应该至少颠倒离心管 20 次确保沉淀完全。

7. 10,000 \times g 离心 3 分钟，倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。如果样品的白细胞数量足够多，可以看到白色的 DNA 沉淀。

8. 加入 150 μ l 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒钟，10,000 \times g 离心 3 分钟，倒弃上清。重复步骤一次。

9. 将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 分钟，确保沉淀在管中。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。

10. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净 (至少 5 分钟)。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。但是要避免过分干燥 DNA 沉淀，因为过于干燥的 DNA 很难溶解。

11. 加入 200 μ l 洗脱缓冲液 TE，低速涡旋 5 秒，65 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟~1 小时溶解 DNA，其间轻弹数次助溶。

注意：如果 DNA 没有完全溶解，可室温过夜。如果使用少量的缓冲液 TB 解 DNA，孵育时间可能需要延长。

二、中量全血操作流程 (1 - 10ml 血样；以 5ml 血液处理量为例)

1. 向 5ml 含抗凝剂的血液中加入 5ml 1 \times 红细胞裂解液 L (10 \times 红细胞裂解液 L 需要稀释为 1 \times 使用), 颠倒混匀 5 次，2000 \times g 离心 5 分钟，倒弃上清；

2. 再向其中加入 7.5ml 细胞裂解液 L，颠倒混匀 5 次，10,000 \times g 离心 5 分钟，倒弃上清，将离心管倒置在干净的吸水纸上停留 2 分钟，确保沉淀在管中 (**此步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖底离心管**)。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。

3. 按照表 1 配制缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后 1 小时之内用完。

4. 加入 2.5ml 缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：当处理多个样品时，加入缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液后要立刻涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再涡旋振荡。通常涡旋混匀 5 秒就足以混匀沉淀，但是有可能痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液 (具体补加量见表 1)，再次涡旋混匀。

5. 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 - 30min，其间颠倒混匀数次。

注意：溶液的颜色从红色变为黄绿色，表示蛋白成分在发生变性。

6. 加入 2.5ml 异丙醇，颠倒充分混匀至出现丝状或簇状基因组 DNA。
注意：与异丙醇完全混合对于沉淀 DNA 非常重要，应该仔细观察。对于白细胞数目很少的样品，DNA 沉淀可能看不到，此时应该至少颠倒离心管 20 次确保沉淀完全。
7. 10,000×g 离心 10 分钟，倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。
注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。如果样品的白细胞数量足够多，可以看到白色的 DNA 沉淀。
8. 加入 2.5ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒钟，10,000×g 离心 5 分钟，倒弃上清。重复此步骤一次。
9. 将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 分钟，确保沉淀在管中。
注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁中上清的回流。
10. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 分钟）。
注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。但是要避免过分干燥 DNA 沉淀，因为过于干燥的 DNA 很难溶解。
11. 加入 500μl 洗脱缓冲液 TE，低速涡旋 5 秒，65°C 加热 1 小时溶解 DNA，其间轻弹数次助溶。
注意：如果 DNA 没有完全溶解，可室温振荡过夜。如果使用少量的缓冲液 TB 解 DNA，孵育时间可能需要延长。

三、大量全血操作流程（10 - 20ml 血样）

此流程裂解溶液的裂解能力可完全裂解 10~20ml 全血样本，并快速纯化得到高纯基因组 DNA。

1. 处理样品：
 - a. 离心富集有核细胞进行核酸提取：将血样 3000×g 离心 15-20 分钟，抽弃血浆，取中间白膜层细胞加入到 15ml 离心管中，加入 10ml 1×红细胞裂解液 L（**10×红细胞裂解液 L 需要稀释为 1×使用**），涡旋混匀 10 秒，10,000×g 离心 5 分钟，倒弃上清。

- b. 细胞裂解液 L 处理血液标本分次富集有核细胞进行核酸提取：在 15ml 离心管中添加细胞裂解液 L 和血液样本（比例 1:1），多次富集进行下游实验。（例 15ml 全血处理方式：在 15ml 离心管中加入 7.5ml 的全血和 7.5ml 细胞裂解液 L，颠倒混匀 5 次，10,000×g 离心 5 分钟，倒弃上清；再向其中加入 7.5ml 全血和 7.5ml 细胞裂解液 L，涡旋混匀 10 秒，10,000×g 离心 5 分钟，倒弃上清，进行下游操作。）
注意：细胞裂解液 L 处理步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖端离心管。在极少的情况下细胞裂解液 L 处理得到的沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。
2. 按照表 1 配置缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液（比例 100 :1），对于 10 - 20ml 的全血标本，每个样品需要 7.5ml 缓冲液 E 与蛋白酶 K 工作液。
注意：此混合液最好现用现配，并在配好后 1 小时之内用完。
3. 加入 7.5ml 缓冲液 E 与蛋白酶 K 的混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。
注意：当处理多个样品时，加入缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液后要立刻涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再涡旋振荡。通常涡旋混匀 30 秒就足以混匀沉淀，但是有可能痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加 1ml 缓冲液 E 和蛋白酶 K 的混合液，再次涡旋混匀。
4. 65°C 水浴 30min，其间颠倒混匀数次。
注意：溶液的颜色从红色变为黄绿色，表示蛋白成分在发生变性。
5. 加入 7.5ml 异丙醇，颠倒充分混匀至出现丝状或簇状基因组 DNA。
注意：与异丙醇完全混合对于沉淀 DNA 非常重要，应该仔细观察。应该至少颠倒离心管 20 次确保沉淀完全。
6. 离心 10,000×g 离心 3 分钟，倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。
注意：如果得到的团块过于松弛，可以延长离心时间或者增大离心力。
7. 加入 7.5ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒钟，离心 2000×g 离心 3 分钟，倒弃上清。重复此步骤一次。
注意：如果得到的团块过于松弛，可以延长离心时间或者增大离心力。

8. 将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 分钟，确保沉淀在管中。
注意：在极少情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。
9. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 分钟）。
注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。但是要避免过分干燥 DNA 沉淀，因为过于干燥的 DNA 很难溶解。
10. 加入 1ml 洗脱缓冲液 TB，低速涡旋 5 秒，65°C 加热 1 小时溶解 DNA，其间轻弹数次助溶。
注意：如果 DNA 没有完全溶解，可室温振荡过夜。如果使用少量的缓冲液 TB 解 DNA，孵育时间需要延长。

表 1 不同体积血液所需各种缓冲液用量 (μl)

	血液体积 (μl)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	10000~ 20000
细胞裂解液 L	250	750	2500	7500	12500	25000	25000
缓冲液 E	50	150	500	1500	2500	5000	7500
蛋白酶 K	0.5	1.5	5	15	25	50	75
100%异丙醇	50	150	500	1500	2500	5000	7500
70%乙醇	50	150	500	1500	2500	5000	7500
缓冲液 TB	100	200	200	300	500	1000	1000
补加缓冲液 E 和 蛋白酶 K 混合液	10	30	100	300	500	1000	1000