

## 中量全血基因组 DNA 提取试剂盒

*Blood Genomic DNA Kit*

(溶液型)

目录号: SD03

### 产品内容

试剂盒组成	保存	SD03-1 10 次	SD03-2 50 次
Buffer A (10×红细胞裂解液)	室温	10 ml	45 ml
Buffer B (裂解液)	室温	30 ml	150 ml
Buffer C (蛋白沉淀液)	室温	10 ml	50 ml
Buffer TE	室温	5 ml	20 ml

本试剂盒组成中各溶液的量均为提取 3ml 全血/次的规格。本试剂盒还可处理 20 ul-10 ml 的全血，其他处理量可按照比例放大或缩小各试剂用量，特殊处理量可联系我们按照您的要求定制。

### 其他相关产品

目录号	名称	规格	保存	是否必备	说明
ST58	红细胞裂解液	--	常温	选配	按照具体实验选择规格
ST53	RNase A	10mg	-20 °C	选配	本试剂盒 10 次需备 1 支

溶解方法：短暂离心后，加入 1 毫升灭菌水或 TE Buffer(pH 8.0)溶解，溶解后请根据自己的使用情况分装成小管冻存并于 -20°C 保存，以免反复冻融失活。

### 储存条件

该试剂盒置于室温（15-25 °C）干燥条件下可保存 18 个月；更长时间的保存可置于 2-8 °C。在 2-8 °C 保存条件下，若产生沉淀，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37 °C 水浴中预热 10 min，以溶解沉淀。避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

### 产品简介

本试剂盒根据全血特点采用几个快速步骤提取基因组 DNA。红细胞裂解液裂解可去除不含 DNA 的红细胞，细胞核裂解液裂解白细胞释放出基因组 DNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后通过异丙醇沉淀出基因组 DNA。

---

## 产品特点

不需使用有毒的苯酚，无需乙醇沉淀

不需蛋白酶 K 消化，省时省力

操作便捷，产量高

标准产量为 3 ml 全血可提取出 50-150  $\mu\text{g}$  基因组 DNA；产物可直接用于下游实验

## 注意事项（请在使用本试剂盒前务必仔细阅读此项）

- 1 自备试剂：异丙醇和 70%乙醇
- 2 开始实验前将需要的水浴先预热到 65  $^{\circ}\text{C}$  备用
- 3 本试剂盒为溶液型，可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的全血量（20  $\mu\text{l}$ -10 ml），请联系我们索取其它处理量的操作手册
- 4 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4  $^{\circ}\text{C}$  存放少于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量
- 5 其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本
- 6 不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此产量的个体差异也可能非常大
- 7 对于每个样品提取血量大或者用量大的客户，可以和我们联系，我们另外专门准备有优惠的大包装试剂。

## 操作步骤

**使用前请先用去离子水将 10 $\times$ 红细胞裂解液稀释 10 倍到 1 $\times$ ；在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀并做上标记**

1 处理血液材料（本产品适用于处理已添加抗凝剂的 20  $\mu\text{l}$ -10 ml 血液样品）

吸取 3 ml 血液样品至 15 ml 离心管中，加入 3 倍体积即 9 ml 的 1 $\times$ 红细胞裂解液，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀，室温放置 10 分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次，帮助裂解红细胞），2,500 $\times g$  离心 2 分钟，尽可能多的弃掉红色上清，留下管底白色细胞团沉淀和少许残留上清（也有可能少量红细胞残片和白细胞团在一起。若管底还有大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，可重复此步骤）涡旋振荡直到白细胞团充分重悬、分散。

**注意：白细胞的重悬分散对下一步裂解非常重要，白细胞未打散就加入细胞核裂解液，会导致白细胞不能充分裂解，形成肉眼可见团块影响 DNA 产量。**

2 加入 3 ml Buffer B (裂解液) 到重悬的白细胞中，上下吹打裂解白细胞，或者剧烈涡旋 10 sec 帮助裂解白细胞。如果是肝素抗凝的血样，白细胞团块很难打散，加入裂解液后应该在 65  $^{\circ}\text{C}$  温育帮助裂解直到看不见细胞团块。

**注意：如果需要去除 RNA，可加入 100  $\mu\text{l}$  RNase A (10 mg/ml) 溶液（客户自备，参考上述目录号），颠倒约 25 次混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  温育 15 min 去除残留 RNA，冷却至室温。**

3 加入 1 ml Buffer C (沉淀蛋白液) 后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。

4 2,500 $\times g$  离心 5 min，小心吸取上清（大约 3 ml）到一个新的 15 ml 离心管中。注意不要吸到管底和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。

5 加入等体积的室温异丙醇（3 ml），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

6 2,000 $\times g$  离心 3 min，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

7 加入 3 ml 70%乙醇, 上下颠倒几次, 2,000×g 离心 1 min, 倒去上清(注意不要倒掉 DNA 沉淀)

8 将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 min, 确保沉淀在管中。

9 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净(至少 5 min)

**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 250 μl Buffer TE 重新溶解 DNA 沉淀, 轻弹管壁混匀, 可以放置在 65 °C 温育 30-60 min (不要超过一小时), 期间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4 °C 放置过夜来重新水化 DNA。DNA 可以存放在 2-8 °C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 °C。

### 问题与解决方法

问题	评论与建议
标本中含有血凝块	*不恰当的存放标本, 未充分混匀, 未使用合适的抗凝剂- <b>建议:</b> 丢弃含有血凝块的标本, 重新用 EDTA,肝素, 柠檬酸抗凝剂收集血液。
红细胞裂解不完全	*血液标本裂解前没有回复到室温- <b>建议:</b> 处理前先把血液标本回复到室温。 *裂解时间不够- <b>建议:</b> 可延长裂解时间至 15 分钟以上。 *没有充分混匀- <b>建议:</b> 裂解过程中可以更多次颠倒混匀, 或者轻弹管壁帮助裂解。
DNA 产量低	*血液标本中本身含有的白细胞数量低- <b>建议:</b> 增加起始血液处理量。 *白细胞裂解不完全- <b>建议:</b> 加入裂解液之前, 必须剧烈涡旋振荡, 打散重悬白细胞沉淀团块, 否则很难裂解完全。如果是肝素抗凝的血样, 白细胞团块很难打散, 加入裂解液后应该在 65 °C 温育帮助裂解直到看不见细胞团块。白细胞数量太大超出裂解能力, 适当增加细胞核裂解液体积。 *血液标本存放时间太长- <b>建议:</b> 存放在 4 °C 的血液标本超过 5 天的产量可能大大降低, 因此不要存放太久。 * DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了- <b>建议:</b> 异丙醇沉淀后用乙醇洗涤的过程中, 倒弃上清的时候要格外小心, 不要把 DNA 沉淀也倒掉了。
DNA 长度小于 20kb	*血液样品太老或者不正确的存放, 造成 DNA 降解- <b>建议:</b> 选用新鲜的血液样品。 *操作不当, 造成对基因组 DNA 的剪切- <b>建议:</b> 混匀轻柔, 不可以用手剧烈振荡离心管, 选用大口径的枪头转移或者混匀 DNA。

问题	评论与建议
未见到蛋白沉淀	<p>*加入蛋白沉淀液前，裂解混合物没有冷却回室温-<b>建议</b>：冷却至室温或者冰上放置 5 分钟后再加入蛋白沉淀液。</p> <p>*蛋白沉淀液没有和裂解混合物充分混匀-<b>建议</b>：应该连续高速涡旋振荡混匀 25 秒，涡旋并不会剪切断 DNA。</p>
A260/A280 <1.6	<p>*污染有蛋白质-<b>建议</b>：看看上述“未见到蛋白沉淀”问题的评论与建议，确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤 4，防止蛋白污染。</p> <p>*测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-<b>建议</b>：使用 TE 缓冲液来稀释 DNA,保证 pH 值大于 8.0。</p>
DNA 沉淀难以重新溶解水化	<p>*晾干 DNA 沉淀时过度了-<b>建议</b>：晾干时密切观察，不要干燥过头，注意应该观察管底的 DNA 沉淀，有时候管壁上的残留乙醇已经挥发，但留下一些水分还没有干，只要管底 DNA 干了就可以加入 DNA 溶解液。可在 65℃温育帮助重新溶解（不要超过一小时）然后室温或者 4℃放置过夜，期间可以颠倒轻弹帮助溶解。</p>
下游酶切不开	<p>* DNA 未干燥完全，残留乙醇太多-<b>建议</b>：敞开离心管口，在 65℃温育几分钟，让乙醇挥发。</p>