

SteadyPure 血液基因组DNA提取试剂盒

SteadyPure Blood Genomic DNA Extraction Kit

Code No. AG21013

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
Package 2-2 室温(15-25°C)

产品概述

本产品是提取哺乳动物新鲜血液或冻存血液中基因组 DNA 的试剂盒，可处理多种抗凝剂的血液样品。本产品采用独特的裂解系统，无需有毒的酚氯仿抽提，利用 RCL Buffer 裂解红细胞，收集获得白细胞。收集获得的白细胞经裂解后再通过 *Blood DNA* Mini Column 获得高纯度、高收量的 DNA。纯化获得的 DNA 可直接用于 PCR 扩增、DNA 序列分析等。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

【注意：实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果缓冲液 Buffer BS-2、Buffer WA 不小心溅出，请立刻用大量清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成*1

| | |
|-------------------------------|--------------|
| RNase A (10 mg/ml) | 500 μl |
| Proteinase K(20 mg/ml) | 1 ml |
| Buffer RCL A*2 | 1 ml X 2 pcs |
| Buffer RCL B*2 | 8 ml |
| Buffer BS-2 | 10 ml |
| Buffer WA | 25 ml |
| Buffer WB*3 | 27 ml |
| Elution Buffer | 20 ml |
| <i>Blood DNA</i> Mini Columns | 50 sets |
| Collection tubes | 50 pcs |

*1：Proteinase K (20 mg/ml) 和 RNase A (10 mg/ml) 包装于 Package 2-1 中，需放置于 -20°C 保存；其余组分均包装于 Package 2-2 中，室温 (15 ~ 25°C) 保存。

*2：RCL A 和 RCL B 使用前按照 1:4 的比例混合，得到 Buffer RCL (红细胞裂解液，此高浓度混合液可于 4°C 保存一个月，为了确保溶液性能，建议现配现用)，然后将上述混合液 Buffer RCL 用灭菌水稀释 10 倍后再进行使用，稀释液需要现配现用。

*3：Buffer WB 在首次使用前，请添加 63 ml 的无水乙醇 (Buffer WB 与无水乙醇体积比为 3 : 7)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

保存及运输

保存温度：Package 2-1 -20°C 保存

Package 2-2 室温 (15-25°C) 保存(温度较低时有的组分会出现沉淀，使用前可 37°C 加热直至沉淀消失，然后使用)

运输温度：Package 2-1 干冰运输或-20°C冰袋运输

Package 2-2 室温运输

实验前准备

1. 无水乙醇、PBS 溶液、1.5 ml 离心管、水浴。

2. 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时，将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 50-65°C 使用，将会提高 DNA 的洗脱效率。

► 注意事项

1. 应尽量使用新鲜全血，避免反复冻融以确保样本中的 DNA 不被降解。若需要将全血样本长期保存，请放置于 -80°C 冻存。
2. 在使用前请确认血液样本红细胞是否有核。有核全血红细胞中 DNA 含量较高，样本起始量需 $\leq 20\ \mu\text{l}$ ；无核全血样本需收集白细胞进行 DNA 提取，样本起始量需 $\leq 1\text{ml}$ 。具体使用方法请参照<操作流程>进行。
3. 样本最好不要超过最大起始量，避免样本裂解不充分，影响 DNA 收量及纯度。
4. 本产品中 *Blood DNA* Mini Column 的最大加样体积为 $750\ \mu\text{l}$ ，使用时如果液体的体积超出最大加样体积，请分次加入：上样 $750\ \mu\text{l}$ 混合液后，离心，弃滤液，然后将剩余混合液再次上样，重复此步骤。
5. 操作过程中，*Blood DNA* Mini Column 的吸附柱需竖直从 Collection tube 或 $1.5\ \text{ml}$ 的离心管中取出（或放入），避免吸附柱柱头触碰管壁，造成污染。
6. 提取的 DNA 需长期保存时，建议使用 Elution Buffer 洗脱 DNA。

► 操作流程

样本准备

| | |
|---------|--|
| 无核红细胞血液 | <p>无核红细胞血液：$100\ \mu\text{l} - 1\ \text{ml}$。</p> <p>总体积不足 $200\ \mu\text{l}$ 的需要用 PBS 补足 $200\ \mu\text{l}$，按步骤 1-14 操作。</p> <p>总体积 $> 200\ \mu\text{l}$ 时，$6000\ \text{rpm}$ 室温离心 $1\ \text{min}$，弃多余上清，保留约 $200\ \mu\text{l}$ 上清及沉淀物，按步骤 1-14 操作。</p> |
| 有核红细胞血液 | <p>有核红细胞血液：$\leq 20\ \mu\text{l}$。</p> <p>全血使用量不要超过 $20\ \mu\text{l}$，用 PBS 补足总体积至 $200\ \mu\text{l}$ 后，按照步骤 6-14 操作。</p> |

1. 红细胞裂解液 Buffer RCL 的配置：实验操作前首先将 1 倍体积的 Buffer RCL A 加入到 4 倍体积的 Buffer RCL B 中，混合均匀，获得高浓度红细胞裂解液 Buffer RCL。将上述高浓度红细胞裂解液 Buffer RCL 用灭菌水稀释 10 倍后即获得工作浓度红细胞裂解液 Buffer RCL，待用。
2. 向 $200\ \mu\text{l}$ 全血样品中加入 $500\ \mu\text{l}$ 的工作浓度红细胞裂解液 Buffer RCL，上下颠倒或使用移液器吹打使样本充分混匀。 $6,000\ \text{rpm}$ 室温离心 $1\ \text{min}$ ，弃上清。
3. 向上述离心管中再次加入 $500\ \mu\text{l}$ 工作浓度红细胞裂解液 Buffer RCL，涡旋混匀，充分打散沉淀。 $6,000\ \text{rpm}$ 室温离心 $1\ \text{min}$ ，弃上清。
4. 观察沉淀中是否残留未被裂解的红细胞（可见明显的红色）。如果发现还有未裂解完全的红细胞存在，则可以重复<操作流程 3>，直至红细胞无明显残留。（大部分全血样本经过 2 次裂解即可将红细胞裂解充分，但红细胞膜较厚的血液样本则需要多次裂解。）
5. 向上述离心管中加入 $200\ \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞。

6. 将 $200\ \mu\text{l}$ Buffer BS-2 和 $20\ \mu\text{l}$ Proteinase K($20\ \text{mg/ml}$) 加入至上述重悬细胞液中，剧烈涡旋至溶液中无明显块状沉淀。
7. 然后加入 $10\ \mu\text{l}$ RNase A($10\ \text{mg/ml}$)，上下颠倒或涡旋使溶液混匀充分， 56°C 温育 $10\ \text{min}$ ，期间可颠倒混匀，至溶液澄清透亮。

【注：若溶液未澄清透亮，可适当延长温育时间】

8. 向上述混合液中加入 $200\ \mu\text{l}$ 无水乙醇，充分吹打混匀。



细胞裂解

9. 将上述混合液全量转移至 *Blood DNA* Mini Column 中，室温静置 $1\ \text{min}$ 后， $12,000\ \text{rpm}$ 室温离心 $1\ \text{min}$ ，弃滤液。



离心、弃滤液



> 操作流程

10. 向上述 *Blood DNA* Mini Column 中加入 500 μ l 的 Buffer WA, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。
11. 向上述 *Blood DNA* Mini Column 中加入 750 μ l 的 Buffer WB, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。

【注：请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】

12. 重复<操作流程 11> 一次。
13. 将上述 *Blood DNA* Mini Column 安置于新的 2.0 ml Collection Tube 中, 12,000 rpm 室温离心 2 min。



500 μ l Buffer WA 洗一次
750 μ l Buffer WB 洗两次

14. 将上述 *Blood DNA* Mini Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管中, 在吸附膜的中央处加入 50 μ l ~ 100 μ l Elution Buffer 或灭菌水, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 DNA, 获得的 DNA 可直接用于后续检测或置于 -20°C 保存。

【注①：将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 $50 \sim 65^{\circ}\text{C}$ 使用时有利于提高洗脱效率；如果想要获得更大收量的 DNA, 可以将操作流程 14 中的洗脱液再次转移至 *Blood DNA* Mini Column 中进行二次洗脱。

②：Elution Buffer 或灭菌水的添加量可根据实际需求的 DNA 浓度调整, 若需求较高浓度的 DNA, 可适当降低 Elution Buffer 或灭菌水的添加量 (例: $30 \sim 50 \mu\text{l}$)。】



洗脱

