



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 少量全血基因组DNA提取试剂盒
 - ◆ 目录号 **DN02**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

小量全血基因组 DNA 提取试剂盒

目录号: **DN02**

目录编号	包装单位
DN0201	50次×0.3ml
DN0202	100次×0.3ml
DN0203	200次×0.3ml

❖ **适用范围:**

适用于快速提取各种动物全血基因组DNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次×0.3ml DN0201	100 次×0.3ml DN0202	200 次×0.3ml DN0203
10x 红细胞裂解液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
细胞核裂解液	室温	15 ml	30 ml	60 ml
蛋白沉淀液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
DNA 溶解液	室温	10 ml	20 ml	20 ml

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。



储存事项:

1. **环境温度低时**细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出**出现浑浊或者沉淀**，可在 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，**不要剧烈摇晃**，以免形成过量的泡沫。
2. 蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**如果不能完全溶解，也不影响使用效果**，直接取用上层溶液即可。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒根据全血特点采用几个快速步骤提取基因组 DNA。首先红细胞裂解液裂解去除不含 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，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

❖ **产品特点:**

1. 从十几个配方中优选出的红细胞裂解液配方，裂解快速完全。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 结果稳定，产量高（典型的产量 300 μ l 全血可提取出 4-15 μ g），OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 50Kb-150kb，可直接用于构建文库、PCR、Southern-blot 和各种酶切反应。



❖ **注意事项**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 用户需自备异丙醇和70%乙醇。
3. 典型的产量300 μ l全血可提取出5-15 μ g 基因组DNA（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）。
4. 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 μ l-10ml），请联系我们索取其它处理量的操作手册。
5. 本试剂盒可运用于多种抗凝剂的全血，如EDTA、柠檬酸、肝素抗凝血。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. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者4 $^{\circ}$ C存放小于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。
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：**（实验前请先阅读注意事项）

1. 吸取 900 μ l 1x 红细胞裂解液（需要先稀释到 1x）到一个 1.5ml 离心管。

注意：使用前应该用去离子水将 **10x 红细胞裂解液稀释 10 倍到 1x**。

2. 将抗凝全血（使用前恢复到室温）颠倒混匀后，吸取 300 μ l 加到上步装有红细胞裂解液的离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。
3. 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）。
4. 12,000rpm 离心 20 秒，倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约 10 μ l 的残留上清。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入 **900 μ l 红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 3, 4**。

5. 涡旋振荡直到白细胞团充分重悬、分散。

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。

6. 加入 300 μ l 细胞核裂解液到重悬的白细胞，上下吹打裂解白细胞，或者剧烈涡旋 10 秒帮助裂解白细胞。
7. **可选步骤，一般不需要：**在裂解物中加入 RNase A（10mg/ml）至终浓度 30 μ g/ml，颠倒 25 次混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟去除残留 RNA，然后冷却回室温。
8. 加入 100 μ l 蛋白沉淀液后，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。
9. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底暗褐色的蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。
10. 小心吸取上清（大约 300 μ l）到一个新的 1.5ml 离心管中。
吸取上清时，注意不要吸到管底和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 **2 分钟**后取上清。
11. 加入等体积的室温异丙醇（300 μ l），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝

状) 白色 DNA 沉淀。

12. 12,000rpm 离心 1 分钟, 在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块, 倒弃上清。
13. 加入 1ml70%乙醇, 颠倒几次漂洗 DNA 沉淀, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒去上清(注意不要把 DNA 沉淀倒掉了), 倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇, 还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇, 空气晾干沉淀几分钟。

注意不要干燥过头, 否则 DNA 极其难溶; 也不能残留太多乙醇, 否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

14. 加入 100 μ lDNA 溶解液重新溶解 DNA 沉淀, 轻弹管壁混匀, 可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟(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 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA。
15. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在-20 $^{\circ}$ 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- 建议 ：丢弃有血凝块的标本，重新用 EDTA,肝素，柠檬酸抗凝剂收集血液。
红细胞裂解不完全	<p>*血液标本裂解前没有恢复到室温-建议：处理前先把血液标本恢复到室温。</p> <p>*裂解时间不够-建议：可延长裂解时间至 15 分钟以上。</p> <p>*没有充分混匀-建议：裂解过程中可以更多次颠倒混匀，或者轻弹管壁帮助裂解。</p>
DNA 产量低	<p>*血液标本中本身含有的白细胞数量低-建议：增加起始血液处理量。</p> <p>*白细胞裂解不完全-建议：仔细阅读步骤 6 的操作要领。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℃ 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。</p> <p>*血液标本存放时间太长-建议：存放在 4℃ 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。</p> <p>*DNA 沉淀在洗涤的时候丢失了-建议：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。</p>
DNA 长度小于 20kb	<p>*血液样品太老或者不正确的存放，造成 DNA 降解-建议：选用新鲜的血液样品。。</p> <p>*操作不当，造成对基因组 DNA 的剪切-建议：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。</p>

问题	评论与建议
未见蛋白沉淀	<p>*加入蛋白沉淀液前，裂解混合物没有冷却回室温-建议：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-建议：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-建议：看看上述“未见蛋白沉淀”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 10，防止蛋白污染。</p> <p>*测定吸光值时用水稀释 DNA 会降低 A260/A280-建议：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-建议：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-建议：敞开离心管口，在 65℃温育几分钟，让乙醇挥发。</p>