

血液基因组柱式中量提取试剂盒（1-5 ml）

项目号：B669892

储存条件：2-8℃。

产品内容

组分	50T
BufferRCL	3×260ml
BufferGR	25ml
BufferGL	25ml
BufferGW1 (concentrate)	13ml
BufferGW2 (concentrate)	15ml
BufferGE	15ml
ProteinaseK	50mg
ProteinaseKStorageBuffer	5ml
SpinColumnsDLwithCollectionTubes	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA 或肝素等抗凝剂处理过的血液样品）、血浆、血清、血沉棕黄层、骨髓、无细胞体液等样本中提取总 DNA，包括基因组 DNA，线粒体 DNA 及病毒 DNA。本品可以处理 1-5ml 的全血，可纯化获得大小为 100bp 到 50kb 的 DNA，纯化的 DNA 产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质，可直接用于 PCR、荧光定量 PCR、酶切和 Southern Blot 等实验。

自备试剂：无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 向 Proteinase K 中加入 5ml Proteinase K Storage Buffer 使其溶解，-20℃ 保存。配制好的 Proteinase K 勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量下降。
3. 本试剂盒最多可以提取 1-5ml 全血样品，如需提取大量血液样本请选用血液基因组非柱式提取试剂盒。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查 Buffer GL 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请置于 56℃ 水浴重新溶解。
6. 如下游实验对 RNA 污染较敏感，可加入 4 μl DNase Free 的 RNase A (100mg/ml)，RNase A 本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购。
7. 试剂盒中的 Buffer RCL 浑浊后不能继续使用。

操作步骤

1. 向离心管（自备）中加入 1-5 ml 血液样品，加入 3 倍体积的 Buffer RCL 轻轻涡旋或颠倒混匀。

2. 3000 rpm ($\sim 900 \times g$) 离心 10 分钟，小心吸弃上清。

3. 向沉淀中加入 400 μ l Buffer GR，重悬沉淀。

注意：如果下游试验对 RNA 敏感，可加入 4 μ l RNase A (100 mg/ml) 溶液，震荡 15 秒，室温放置 5 分钟。

4. 1-2 ml 血液样本提取时，向以上溶液中加入 40 μ l Proteinase K，混匀；2-5ml 血液样本提取时，向以上溶液中加入 100 μ l Proteinase K，混匀。

5. 加入 400 μ l Buffer GL，颠倒混匀 15 次，剧烈涡旋震荡至少 1 分钟。

注意：不要直接将 Proteinase K 直接加入到 Buffer GL 中。

6. 70℃ 孵育 10 分钟，其间颠倒混匀数次。

注意：1) 如溶液未彻底清亮，补加适量 Proteinase K，孵育。延长孵育时间至溶液完全清亮为止。

2) 孵育 10 分钟 DNA 的产量已经达到最大，继续延长孵育时间对 DNA 产量和纯度没有影响。

7. 加入 400 μ l 无水乙醇，颠倒混匀 10 次。短暂离心，使管壁和管盖上液体集中到管底。

8. 将上步所得到的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DL) 中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW1 (使用前检查是否加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：如果提取样品是小鼠或猴子等血红素难以除去的种属的血液基因组，建议重复步骤 9。

10. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer GW2 (使用前检查是否加入无水乙醇)，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：如需进一步提高 DNA 纯度，可重复步骤 10。

11. 12,000 rpm 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附柱中间部位悬空加入 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水，室温下放置 2-5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，-20℃ 保存 DNA。

注意：1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围)，pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量。

3) 用另外的 50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高 DNA 的终浓度，可以将步骤 12 所得的 DNA 洗脱液重新加至吸附膜上，12,000 rpm 离心 1min；若洗脱体积小于 200 μ l，可以增加 DNA 的终浓度，但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1 μ g，推荐用 50 μ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。

5) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20℃ 保存。