

小量全血基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）

货号： NG404S 100 次
NG404M 200 次

试剂盒组成	保存	100 次	200 次
平衡液	室温	10 ml	20 ml
10x 红细胞裂解液 RSL (可选)	室温	15 ml	30 ml
PB 缓冲液	室温	20 ml	40 ml
蛋白酶 K	4°C	20mgx2	20mgx4
结合液 CB	室温	20 ml	40 ml
抑制物去除液 IR	室温	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	30 ml
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

储存事项:

1. 结合液 CB 或者抑制物去除液 IR 低温时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，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
2. 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。

产品介绍:

独特的结合液迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤，抑制物去除液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，典型的产量 200 μ l 全血可提取出 3-12 μ g，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9，长度可达 30 kb -50kb，可直接用于 PCR、Southern-blot 和各种酶切反应。
4. 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，客户可根据需要选择购买。

注意事项:

1. 所有的离心步骤均在室温完成。
2. 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。
3. 需要自备异丙醇。
4. 需要水浴先预热到 70°C 备用。
5. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4°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。
6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保批 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在 -20°C。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

关于平衡液的使用

1. 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其与核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力，从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡

液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C 使沉淀完全消失。

2. 使用方法：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 取 200 μl 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，放入 1.5 ml 离心管。（大量血液参考附录 I）
如果全血起始量小于 200 μl，则用 ddH₂O 补足到 200 μl。如果起始量介于 200 μl-300 μl 之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于 300 μl-1 ml 之间，则需要先进行红细胞裂解操作（见本说明书后附录）。
如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量 5-20 μl，可加 PB 缓冲液补足到 200 μl 后进行后续步骤。
2. 加入 20 μl 的蛋白酶 K 溶液 (20 mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置 10 min。
3. 再加入 200 μl 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀，溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

可选步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μl 结合液 CB 前加 20 μl RNase A (10 mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

平衡液预处理吸附柱备用：使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

4. 冷却后加入 200 μl 无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡 15 秒混匀。
5. 将上一步混合物（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
6. 加入 500 μl 抑制物去除液 IR，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。
7. 加入 600 μl 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。
8. 加入 600 μl 漂洗液 WB，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100 μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 °C 水浴中预热效果更好），室温放置 3-5 min，12,000 rpm 离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。洗脱体积越大，洗脱效率越高。
11. DNA 可以存放在 2-8 °C，如果要长时间存放，可以放置在 -20 °C。

附录 I 大体积血液（全血）裂解：操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

1. 吸取 900 μl ddH₂O 和 100 μl 10x 红细胞裂解液（稀释到 1x）到一个 1.5 ml 离心管。
2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300 μl 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 min（期间应该颠倒轻弹，混匀数次帮助裂解红细胞）。
4. 12,000 rpm 离心 20 sec，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 50 μl 的残留上清。

注：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，应该重复步骤 1-3 操作，重新裂解红细胞。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。