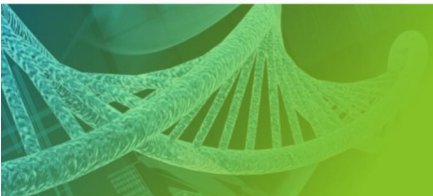
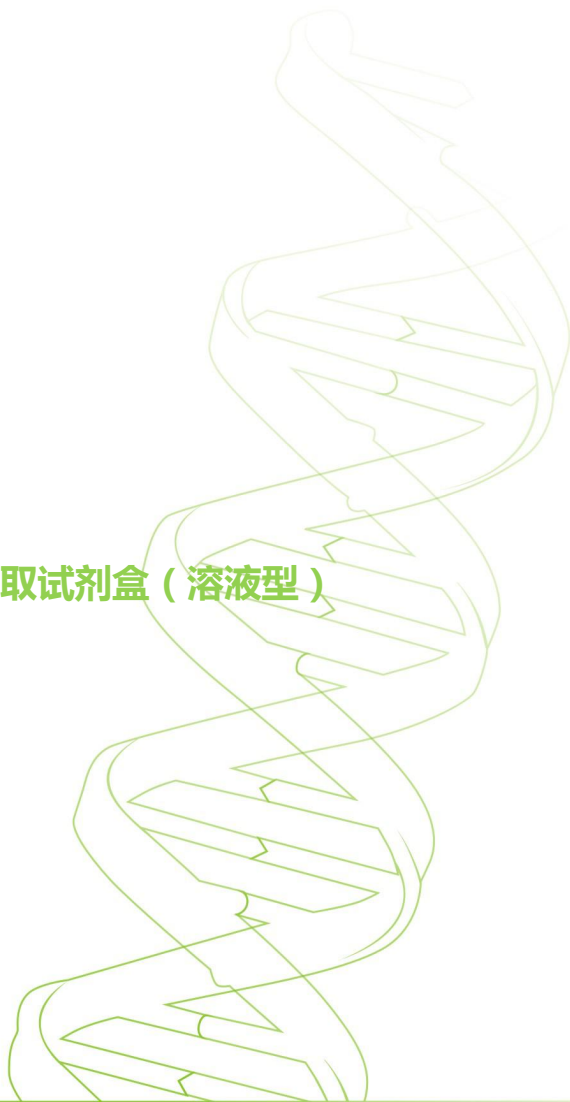


Imagene®

Bloodmidi DNA Kit

中量全血基因组 DNA 提取试剂盒（溶液型）



CODI NX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

中量全血基因组 DNA 提取试剂盒(溶液型)

目录号 DE104

使用说明书

网站: www.codonx.com
咨询电话: 010-56315162
技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/常见问题与解决方案

1/适用范围:

适用于快速提取各种动物全血基因组DNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20 次×3ml	50 次×3ml
		(DE104-01)	(DE104-02)
<u>10×红细胞裂解液 RLB</u>	室温	20 ml	45ml
细胞核裂解液 NLS	室温	60 ml	150 ml
蛋白沉淀液 PPS	室温	20 ml	50 ml
DNA 溶解液 DS	室温	10 ml	20 ml

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

1. 环境温度低时细胞核裂解液 NLS 中某些去污剂成份会析出出现浑浊或者沉淀,可在 37℃ 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 PPS 可能出现析出和沉淀,可以在 37℃ 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。

4/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 RLB 裂解去除不含 DNA 的红细胞,细胞核裂解液 NLS 裂解白细胞释放出基因组 DNA,然后蛋白沉淀液 PPS 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于 DNA 溶解液。

5/产品特点:

1. 从十几个配方中优选出的红细胞裂解液 RLB 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 1 小时内完成。
4. 结果稳定，产量高（典型的产量 3ml 全血可提取出 50-150 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。

6/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 2,500 x g，并配备容纳 15ml 离心管转头的传统台式离心机。
2. 用户需自备异丙醇和 70% 乙醇。
3. 典型的产量 3ml 全血可提取出 75-150 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/操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

1. 吸取 9ml 1x 红细胞裂解液 RLB 到一个 15ml 离心管。
使用前应该用去离子水将 10x 红细胞裂解液 RLB 稀释 10 倍到 1x。
2. 将抗凝全血（**使用前回复到室温**）颠倒混匀后，吸取 3ml 加到上步装有红细胞裂解液 RLB 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. 2,500 x g 离心 2 分钟，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 50 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，应该再加入适量红细胞裂解液 RLB 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 3ml 细胞核裂解液 NLS 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：**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 1ml 蛋白沉淀液 PPS 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. 2,500 x g(可根据需要调整加大离心力)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 3ml)到一个新的 15ml 离心管中。

吸取上清时，注意不要吸到管底的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 (3ml)，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. 2,000 x g 离心 3 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

13. 加入 3ml 70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000 x g 离心 1 分钟，倒去上清(沉淀很松，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 250 μ l DNA 溶解液 DS (如果需要浓度高，可根据需要减少 DNA 溶解液 DS 用量)重新水化溶解 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)，也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA，中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 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。

8/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恢复到室温- 建议 ：处理前先把血液标本恢复到室温。 *裂解时间不够- 建议 ：可延长裂解时间至 15 分钟以上。 *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。
DNA 产量低	*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。 *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 NLS 体积。 *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。 *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。
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- 建议 ：选用新鲜的血液样品。 *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。
未见蛋白沉淀	*加入蛋白沉淀液 PPS 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 PPS。 *蛋白沉淀液 PPS 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。

A260/A280 *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。

<1.6 *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。

DNA 沉淀难以重新溶解水化 *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°C 温育帮助重新溶解 (不要超过一小时) 然后室温或者 4°C 放置过夜, 期间可以颠倒轻弹帮助溶解。

下游酶切不开 *DNA 未干燥完全, 残留乙醇太多-**建议**: 敞开离心管口, 在 65°C 温育几分钟, 让乙醇挥发。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com