

血液基因组 DNA 大量提取试剂盒 (硅胶膜离心柱法)

产品组分

组分	N1123	N1124
红细胞裂解液 RS	200 ml	500 ml×2
消化缓冲液 DS	75 ml	400 ml
裂解液 MS	100 ml	500 ml
蛋白酶 K	5 ml	25 ml
去蛋白液 PS	150 ml	400 ml×2
漂洗液 PE	75 ml	100 ml×4
纯化液 TE	20 ml	100 ml
DNA 纯化柱	10 个	50 个
说明书	1 份	1 份

- 裂解液 MS 中含变性剂, 请不要直接接触皮肤。
- 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 3 稀释, 即含 75%乙醇。

产品说明

本产品可用于全血样本的基因组 DNA 的纯化。纯化原理是首先利用红细胞裂解液先去除血液中的红细胞*, 细胞裂解液裂解细胞核释放基因组 DNA, 由硅胶膜柱可逆吸附体系内的基因组 DNA, 经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质等杂质后, 用纯化液洗脱获得基因组 DNA。本产品适用于未凝固全血, 以及经各种抗凝剂 (EDTA、肝素、柠檬酸) 处理过的全血样本。一次可从 5-10 ml 全血中提取到 30-200 µg 高纯度基因组 DNA ($OD_{260}/OD_{280} = 1.7-1.9$), 此基因组 DNA 可直接用于 PCR、酶切等后续实验。

*本产品不能从全血中直接提取 DNA, 要去除血液中红细胞后才能得到高浓度的基因组 DNA。如要直接从全血迅速提取高纯度基因组 DNA, 建议选择 Quick 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (东盛货号: N1131、N1132)。

质量控制

纯化的基因组 DNA 质量通过限制性酶切和单拷基因的 PCR 扩增鉴定。

保存条件

蛋白酶 K 于 -20℃ 保存。

其余试剂置于室温 (15-25℃) 干燥条件下保存 1 年。

如果消化缓冲液 DS 和 MS 中有沉淀, 可在 55℃ 加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 的纯化效率。

注意事项

- 漂洗液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入 3 倍体积的无水乙醇, 即 75 ml 漂洗液 PE 加入 225 ml 无水乙醇, 100 ml 漂洗液 PE 加入 300 ml 无水乙醇, 使用后应立即盖紧盖子。
- 消化缓冲液 DS 和裂解液 MS 室温保存可能会有沉淀产生, 在 55℃ 加热溶解, 待恢复室温后混匀即可使用。不会影响基因组 DNA 纯化效率。
- 柠檬酸、EDTA 和肝素三种抗凝剂均可使用。但肝素对酶促反应有可能起抑制作用。采血时如没有特殊要求, 请使用柠檬酸或 EDTA 处理血样。
- 基因组 DNA 的得率, 会因抗凝剂的种类以及血液保存条件的不同而各异。
- 基因组 DNA 需长期保存时, 建议使用纯化液 TE。用无菌的离心管分装后保存于 -20℃ 或 -80℃。
- 所有离心步骤均为室温下进行。
- 请严格按照操作步骤操作。

操作步骤

- 1 取血液样本，每 5-10 ml 血液加入到一支 50 ml 离心管中。加入 2 倍体积的红细胞裂解液 RS。漩涡振荡或上下来回颠倒混匀。5,000 rpm 离心 3min，弃上清，收集白色或淡红色沉淀，重复上述步骤，注意不能把沉淀倒掉。
 - 如沉淀仍然呈深红色，表明红细胞裂解不充分，可再加等体积红细胞裂解液 RS 处理一次。
 - 对于哺乳动物全血，每 5-10 ml 全血中可提取 30-200 μg 的基因组 DNA。如从鸟类、两栖类或更低级的动物血液中提取基因组 DNA，因其血液红细胞有细胞核，血液用量勿超过 500 μl /离心管。每 500 μl 全血中可提取 200 μg 的基因组 DNA。
- 2 加入 5 ml 消化缓冲液 DS，漩涡振荡至形成完全均一的悬浮液。
 - 如需去除 RNA，可加入 100 μl RNase A (100 mg/ml)，振荡 15 秒，室温放置 5min。
- 3 加入 500 μl 蛋白酶 K 和 5.5 ml 裂解液 MS，漩涡振荡混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
 - 加入裂解液 MS 时可能会产生白色沉淀，一般 65 $^{\circ}\text{C}$ 放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。
- 4 加入 5.5 ml 无水乙醇，上下颠倒混匀，此时可能出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中，12,000rpm 离心 1min，弃滤液。
 - 此时基因组 DNA 被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。
- 5 加入 10 ml 去蛋白液 PS，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。
 - 此步骤的作用是去除硅胶膜上吸附的蛋白、脂质等杂质，以获得高质量基因组 DNA。
- 6 加入 10 ml 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。
 - 漂洗液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:3 稀释，即含 75%乙醇。
- 7 加入 10 ml 漂洗液 PE，12,000 rpm 离心 1min，弃滤液。
- 8 12,000 rpm 离心 3min，以彻底去除纯化柱中残留的液体。
 - 此步骤的作用是去除残留乙醇，避免影响后续的酶促反应 (PCR 或酶切)。同时利于基因组 DNA 充分溶解。
- 9 将纯化柱置于新的 50ml 离心管中。向纯化柱中央处，悬空滴加 600-1000 μl 洗脱液 TE，室温放置 2min。
- 10 12,000 rpm 离心 2min，管底即为高纯度基因组 DNA，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
 - 洗脱液 TE 可用去离子水代替，但其 pH 需为 8.0-8.5。
 - 对洗脱液 TE 60 $^{\circ}\text{C}$ 预热，会提高基因组 DNA 的产量。

Q&A

问：血液基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA，为什么？

答：血液基因一般非常容易提取，出现提不出来的情况多数是收集白细胞的时候把沉淀随着上清倒掉。

问：提取的基因组 DNA 有降解，为什么？

答：选取的实验材料不够新鲜，采集后的组织材料未及时处理或未低温保存。血样在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 2 个月一般可以提取到完整的 DNA。长期保存请放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或以下温度的环境。