

一般实验室使用，仅用于 *体外*

大量全血基因组DNA提取试剂盒 (溶液型)

用于快速提取各种动物全血基因组DNA

目录号: **DP2201 (16次)** **DP2202 (32次)**

使用手册

2009年4月, 第3版



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址: 北京海淀区留学人员创业园

电 话: 010-62951781

传 真: 010-62951781

网 址: www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	16次 (DP2201)	32次 (DP2102)
10×红细胞裂解液	室温	100 ml	200 ml
细胞核裂解液	室温	180 ml	350 ml
蛋白沉淀液	室温	55 ml	110 ml
DNA 溶解液	室温	15 ml	30 ml

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

注意事项

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℃ 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℃ 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。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
标本中含有血凝块	不恰当的存放标本，未充分混匀，未使用合适的抗凝收集管	丢弃有血凝块的标本，重新用 EDTA、肝素、柠檬酸抗凝管收集血液。
红细胞裂解不完全	血液标本裂解前没有回复到室温	处理前先把血液标本回复到室温。
	裂解时间不够	可延长裂解时间至 15 分钟以上。
	裂解过程中没有多次混匀	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	增加起始血液处理量
	白细胞裂解不完全	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。
	血液标本存放时间太长	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	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。

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
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	选用新鲜的血液样品。
	操作不当,造成对基因组DNA的剪切	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。
未见到蛋白沉淀 A260/A280 <1.6	加入蛋白沉淀液前,裂解混合物没有冷却回室温	冷却至室温或者冰上放置5分钟后再加入蛋白沉淀液。
	蛋白沉淀液没有和裂解混合物充分混匀	应该连续高速涡旋振荡混匀25秒,涡旋并不会剪切断DNA。
	污染有蛋白质	看看上述“未见到蛋白沉淀”问题的解决方法,确保蛋白通过沉淀去除。另外请参见步骤9,防止蛋白污染。
	测定吸光值时用水稀释DNA会降低A260/A280	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	晾干时候密切观察,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。
下游酶切不开	DNA未干燥完全,残留乙醇太多	敞开离心管口,在65℃温育几分钟,让乙醇挥发。

目 录

一、试剂盒组成、储存、稳定性.....	1
二、原理简介.....	2
三、试剂盒特点.....	2
四、注意事项.....	2
五、操作步骤.....	3
六、疑难解答.....	6

6. 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。**
7. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4℃ 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。
8. 对于每个样品提取血量大的客户或者用量大的客户，可以和我们联系，我们另有专门准备有优惠的大包装试剂。

五、操作步骤

1. 吸取 30ml 红细胞裂解液到一个 50ml 离心管。
2. 将抗凝全血（**使用前回复到室温**）混匀后，吸取 10ml 加到上述装有红细胞裂解液离心管中，颠倒 6-8 次，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或者摇床上面轻摇帮助裂解红细胞）。
4. 2,000 x g 离心 10 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 100 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重悬细胞团后重复步骤 3，4。

5. 涡旋振荡 15 秒重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

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 10ml 细胞核裂解液到重悬的白细胞，迅速有力吹打几次混匀 以裂解白细胞，由于基因组 DNA 立刻释放出来，这个时候混合物会马上变得十分粘稠，立刻停止吹打（以免剪切断基因组 DNA），颠倒旋转离心管 10 次保证裂解液和所有的白细胞接触并裂解。

这一步对是否获得满意的裂解效果和基因组完整性很关键。吹打力量如果太小，不足以迅速将细胞团打散并和裂解液混匀，形成肉眼可见团块无法裂解完全（裂解液如果是和细胞团块而不是分散的细胞接触，立刻会和细胞团块表面作用后形成粘稠的屏障，不容易再渗透入团块内部）。裂解液和细胞接触后基因组 DNA 立刻释放出来，这个时候吹打力量过大，又易造成基因组断裂。正确做法，就是迅速有力的吹打几次，几秒钟后基因组释放出来（变粘稠）立刻停止吹打，或者改用大口径枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打或者颠倒混匀。如果还有肉眼可见团块，可在 65℃ 温育 30-60 分钟（不要超过一小时）至裂解完全。

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℃ 温育 15 分钟去除残留 RNA。然后冷却回室温。
8. 加入 3.33ml 蛋白沉淀液后，在**涡旋振荡器**上**高速连续振荡混匀 20-25 秒**。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。

由于样品体积重量小，用**涡旋振荡器**振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA，如果用手振荡混匀，则不可以用手上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA，但是力度也不能小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开，离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分，最后的产物污染有较多量的蛋白质。因此建议新手还是用**涡旋振荡器**混匀。

9. 2,000 x g (可根据离心效果(沉淀如果不紧)调整加大离心力)离心 10 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 10ml）到一个新的 15ml 离心管中。

吸取上清时小心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（约 10ml），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。

注意有时候棉絮状（丝状）DNA 沉淀颠倒混匀的时候，粘附着在盖子或者管口处，即使颠倒也不跟下来，或者附着有气泡导致漂浮在液面，这样导致操作者看不到沉淀，误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 12，直接 2,000 x g 离心 1 分钟，弃上清，然后接步骤 14。

12. 垂直放置离心管，让白色 DNA 沉淀自然沉到管底，然后尽可能多的吸弃大部分的上清，注意不要吸到沉淀。

13. 加入 10ml 70%乙醇后，颠倒混匀，2,000 x g 离心 1-3 分钟，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

14. 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。

15. 加入 600μl DNA（或者根据浓度需要调整用量）溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65℃温育 30-60 分钟（不要超过一小时），也可以在室温或者 4℃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。

16. DNA 可以存放在 2-8℃，如果要长时间存放，可以放置在 -20℃。

二、原理简介

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。

三、试剂盒特点

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 1 小时内完成。
4. 结果稳定，产量高（典型的产量 10ml 全血可提取出 150-500μg），OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9，长度可高达 50Kb-150kb，可直接用于构建文库，PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 2,000 x g，并配备容纳 50ml 离心管转头的传统台式离心机。
2. 为便于运输。红细胞裂解液为 10×，使用时请稀释成 1×。
3. 用户需自备异丙醇和 70%乙醇。
4. 典型的产量 10ml 全血可提取出 150-500μg 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）。
5. 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（20μl-10ml），请联系我们索取其它处理量的操作手册。