

全血基因组DNA快速提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取全血基因组DNA

目录号: SG011 (50次) SG012 (100次)

使用手册

2010年12月, 第5版



北京三博远志生物技术有限责任公司
Beijing Sunbiotech Co., Ltd

地 址: 北京海淀区东北旺南路 26 号

电 话: 010-62961251 62976446 传真: 010-62961251

网 址: 阳光生物网 <http://www.sunbiotech.com.cn>

Email: market@sunbiotech.com.cn



北京三博远志生物技术有限责任公司
Beijing Sunbiotech Co., Ltd

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (SG011)	100次 (SG012)
红细胞裂解液 SR	室温	60ml	120ml
缓冲液 SL	室温	10ml	20ml
结合液 SB	室温	10ml	20ml
漂洗液 PW	室温	15ml	15ml×2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱液 EB	室温	10ml	20ml
蛋白酶 K (20mg/ml)	-20℃	1ml	2ml
吸附柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

1. 本试剂盒适合处理 100ul~1ml 添加各种抗凝血剂的哺乳动物血液样品。也适合禽类、两栖类全血样品。
2. 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 PW 中加入 60ml 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！
3. 结合液 SB 低温时可能出现析出，可以在 58℃ 水浴几分钟重新溶解，恢复澄清后即可使用。
4. 反复冻融会降低酶活性，为避免降低蛋白酶 K 活性，蛋白酶 K 应按照每次使用量 (20 微升) 分装冻存，-20℃ 保存。
5. 避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化或 pH 值变化，各溶液使用后应及时紧盖子。

接上表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	忘记做步骤 7，乙醇抑制了酶切反应	做步骤 7，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。
	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 长度小于 15kb	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。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
洗脱下来的 DNA 溶液还带有轻微的颜色	漂洗不完全	1. 漂洗，直到离心下来的液体没有颜色。 2. 将洗脱液当成起始材料，再重复一遍实验，注意略去蛋白酶 K 消化和 70℃ 孵育步骤。

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恢复到室温	处理前先把血液标本恢复到室温。
	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
	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。
	蛋白酶 K 失效了	避免反复冻融蛋白酶 K。
	裂解不完全或者和乙醇没有充分混匀	加入缓冲液 SL 和加入蛋白酶 K 后立即吹打混匀。 加入无水乙醇后应该和裂解物充分混匀后再加入吸附柱。
	洗脱效率不高	确保做了步骤 8, 否则残留乙醇会影响洗脱效率, 使用洗脱缓冲液 EB 洗脱或 pH 在 7.5-8.5 之间的去离子水洗脱。

接下表

二、原理简介

高效红细胞裂解液首先去除血液中含有细胞核的红细胞, 通过离心回收白细胞, 经过细胞核裂解液裂解释放基因组 DNA, 硅胶膜特异性吸附 DNA, 通过漂洗去除蛋白质和其他杂质, 最后用低盐溶液洗脱得到高纯基因组 DNA。不需酚、氯仿等毒性有机溶剂抽提以及乙醇沉淀等步骤, 速度快、纯度高, 适用于 PCR、酶切等下游试验。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱硅胶膜采用进口产品, 柱与柱之间吸附量差异小, 可重复性好。
2. 不需使用有毒的苯酚等试剂, 也不需乙醇沉淀。操作步骤比其他同类盒子简捷、快速, 单个样品一小时内可获得高纯基因组 DNA。
3. 超纯: 获得的 DNA 纯度高, 可直接用于 PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。一般 200 μ l 健康人全血可提取出 3-6 μ g, OD260/OD280 比值在 1.7~1.9 之间, 长度可达 23kb-50kb。
4. 储存时间长: 独特的洗脱液 EB 配方可使 DNA 长期存放。

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。
2. 一般 200 μ l 健康人全血可提取出 3-6 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)。
3. 实验前将需要的水浴先预热到 58℃ 备用。

最好使用新鲜血液标本或者 4℃ 存放少于 3 天的标本, 不要使用反

4. 复冻融超过3次的标本，否则会严重降低产量。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液PW中加入4倍体积的无水乙醇，50次加60ml!

1、处理血液材料(本产品适用于处理已添加抗凝剂的100 μ l-1ml 血液样品):

A、哺乳动物:

a. 取200 μ l血液，加入3倍体积的红细胞裂解液SR (600 μ l) 上下颠倒混匀，室温放置5-10分钟，其间上下颠倒2-3次，混匀。

* 当血液样品体积 100 μ l 时加红细胞裂解液 SR 300 μ l，以此类推。

b. 12000rpm(\sim 13,400 \times g)离心30秒，吸弃上清，重新加入600 μ l红细胞裂解液SR，12000rpm(\sim 13,400 \times g)离心30秒，吸弃上清(注意不要触及或吸出管底白色沉淀);

* 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，但不会影响后续试验结果。

B、禽类、两栖类或更低级生物的抗凝血液:

由于其红细胞为有核细胞，因此处理量5-20 μ l即可，直接做下面步骤。

2、加入200 μ l缓冲液SL，20 μ l 蛋白酶K溶液，混匀，58 $^{\circ}$ C放置2小时(也可消化过夜)，其间下下颠倒2-3次。溶液应变清亮(如溶液未彻底变清亮，请延长裂解时间至溶液清亮为止)。

* 如果需要去除RNA，可加入4 μ l RNaseA (100 mg/ml) 溶液(客户自备)，振荡15秒，室温放置5分钟。

* 以上步骤，每次充分混匀非常重要，否则易造成细胞裂解不彻底，导致柱堵塞或DNA产量降低。

3、加入220 μ l结合液SB，上下颠倒离心管充分混匀，58 $^{\circ}$ C放置10分钟，其间上下颠倒2-3次。

4、加入220 μ l无水乙醇，快速颠倒离心管混匀，此时可能有白色絮状沉淀出现，应将沉淀和溶液一起转移到吸附柱中，12000rpm离心1分钟，弃掉废液

5、向吸附柱中加入700 μ l 漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无醇)，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

6、向吸附柱中加入500 μ l 漂洗液PW，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30秒，倒掉废液。

7、将吸附柱放回清空的收集管中，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)空离心2分钟。将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

* 注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。

8、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位打入50-100 μ l洗脱液EB(洗脱缓冲液预先在70 $^{\circ}$ C水浴中预热)，室温放置3-5分钟，12,000 rpm 离心1分钟。

* 洗脱体积越大，洗脱效率越高，如需要DNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但最小体积不应少于50 μ l，体积过小降低DNA洗脱效率，降低DNA产量。

9、所得基因组DNA溶液放置在-20 $^{\circ}$ C保存。