北京博凌科为生物科技有限公司
Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.
Tel:010-57158602/52872342/80773165（Fax）
Http://www.blkwbio.com/
E-mail:blkwbio@blkwbio.com

- 通用基因组DNA快速提取试剂盒
- 目录号 **1410**
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外

通用基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号：1410

目录编号	包装单位
141001	50次
141002	100次
141003	200次
141011	50次(带蛋白酶K粉)
141012	100次(带蛋白酶K粉)
141013	200次(带蛋白酶K粉)

❖ **适用范围：**

适用于快速提取全血、各种动植物组织细胞基因组DNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性：**

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
裂解液 TL	室温	11 ml	20 ml	40 ml
缓冲液 BB	室温	10 ml	20 ml	40 ml
结合液 CB	室温	15 ml	30 ml	60 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	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	15 ml	15 x 2 ml
蛋白酶 K 粉（可选）20mg/ml	-20℃	20mg	40mg	80mg
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管（2ml）	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 裂解液 TL、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℃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. 为避免降低活性，方便运输，提供**蛋白酶 K 为冻干粉状**，收到后，可短暂离心后，加入 **1 毫升灭菌水溶解**。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量(20 微升)分装冻存，－20℃保存。
3. 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/蛋白酶 K 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， 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。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，典型的产量 200μl 全血可提取出 3-6μg，OD_{260}/OD_{280} 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。
5. 典型的产量 200μl 全血可提取出 3-6μg 基因组 DNA。

❖ **注意事项：**

1. **所有的离心均在室温完成，**使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备1XPBS(磷酸盐缓冲液),和异丙醇。
3. 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. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70℃备用。
5. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4℃存放少于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。

❖ **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. **全血**

a. 取 200ul 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，放入 1.5ml 离心管。

如果全血起始量小于200μl，则用缓冲液BB补足到200μl。如果起始量介于200μl-300μl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300μl-1ml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5-20μl，可加缓冲液BB补足到200μl后进行后续步骤。

b. 加入 20μl 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入 200μl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70℃放置 10 分钟。溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

可选步骤，一般不需要：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以**在加入 200μl 结合液 CB 前**加 20μl RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

c. 冷却后加 100μl 异丙醇，**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。

d. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 60 秒，倒掉收集管中的废液。

e. 接**操作步骤**项下 5。

2. **组织培养细胞**

a. 收集约 10^5-10^6 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b. 13,000rpm 离心 10 秒，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团和大约 10-20μl 残留的液体。

c. 加 200μl 1XPBS 重悬洗涤细胞，13,000rpm 离心 10 秒，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清, 将细胞沉淀重悬于 180μl 1XPBS 中。

d. 加入 20μl 蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入 200μl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70℃放置 10 分钟。

可选做步骤：如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以**在加入 200μl 结合液 CB 前**加 20μl RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

e. 冷却后加 100μl 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 60 秒，倒掉收集管中的废液。

g. 接**操作步骤**项下 5。

3. **动植物组织（例如鼠肝脑或者植物叶片）**

a. 将 20-50mg 新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有 180μl 组织裂解液 TL 的 1.5ml 离心管中， 用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20μl 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

c. 将裂解物放置在 55℃水浴 1-3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 20μl RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

d. 加入 200μl 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70℃放置 10 分钟。

e. 冷却后加 100μl 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

f. 用 1ml 的枪头吸取混合物，将混合物加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 60 秒，倒掉收集管中的废液。

如果有不溶组织物可能堵住枪头，可将枪头在吸水纸上轻蹭去除不溶物；如果吸上来的混合物少则可以将枪头和不溶物一起弃去，该做法是为了去除不溶物，以免堵塞离心柱。

g. 接**操作步骤**项下 5。

4. **动物组织（鼠尾）**

a. 将 0.2-0.5cm 的鼠尾巴尖(即 20-50mg)剪碎**（一定要剪 0-2cm 范围内的尾巴尖，否则裂解效果不好）**，或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有 180μl 组织裂解液 TL 的 1.5ml 离心管中， 用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20μl 的蛋白酶 K(20mg/ml)，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

c. 将裂解物放置在 55℃水浴 3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤: 如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可在完成步骤 c 后加 20μl

RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

d. 用一个 1ml 不带针头的一次性输液器抽打裂解物 2-3 次。

e. 加入 200μl 结合液 CB 和 100μl 异丙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**。

f. **13,000rpm 离心 5 分钟，**将上清加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。

g. 接**操作步骤**项下 5。

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. 加入 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。

6. 加入 700μl 漂洗液 WB**（请先检查是否已加入无水乙醇!）**，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

8. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液， 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

9. 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 100μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热），室温放置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积， 但是最小体积不应少于 50μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

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

❖ **附录（以 300μl，1ml 全血举例红细胞裂解操作）：**

1. 吸取 900μl 红细胞裂解液到一个 1.5ml 离心管或者 3ml 红细胞裂解液到一个 15ml 离心管。（红细胞裂解液可向本公司购买）

2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300μl 全血和 1ml 全血分别加到上述 1.5ml 和 15ml 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. 12,000 rpm 离心 20 秒（对于 1.5ml 离心管）或 2,000-3,000 rpm 离心 5 分钟（对于 15ml 离心管），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 10μl 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，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复 3，4。

5. 加入 200μl 缓冲液 BB 涡旋振荡重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

   其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响后续实验裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。

6. 现在可以按照操作提取全血基因组 DNA 了。