



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/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 微量/临床样品基因组DNA快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1425
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

微量临床样品基因组 DNA 快速提取试剂盒

目录号: 1425

目录编号	包装单位
142501	50次

❖ 适用范围:

适合于从微量血液、法医材料、干血点、药签等微量样品中分离纯化基因组DNA。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50次
裂解液 ML	室温	11 ml
结合液 CB	室温	15 ml
抑制物去除液 IR	室温	25 ml
漂洗液 WB	室温	10ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
Carrier RNA	-20℃	310µg
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml
蛋白酶 K 粉 (可选) 20mg/ml	-20℃	20 mg
吸附柱 AC 和收集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果

储存事项:

1. 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. **Carrier RNA 收到时为冻干粉状, 使用前按照注意事项 4 配制和储存。**
4. 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。仔细阅读注意事项 4。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒采用特制的进口 DNA 吸附柱和独特的缓冲液系统, 特别适合于从微量血液、法医材料、干血点、药签、口香糖、尿液等微量样品中分离纯化基因组 DNA。各种来源样品裂解消化处理后 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜 (特别配备了 Carrier RNA 可以从体系中轻松捕获微量核酸), 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 将盐、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的基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。纯化后的 DNA 无杂质和 PCR 抑制剂, 可直接适用于 PCR 分析。

❖ **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步骤。
2. 节省时间, 简捷, 单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。
3. 配备了 Carrier RNA 用于充分收集特别微量 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, 提取的 DNA 纯度高, 质量稳定可靠, 可适用于各种常规操作, 包括 PCR、酶切、测序、Southern 杂交等。

❖ **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13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到所需温度备用。部分样品需要准备 1M DTT。
3. 结合液 CB 和抑制物去除液 IR 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. **Carrier RNA :**
 - 1) Carrier RNA 收到时为冻干状，使用时加入 310μl RNase free 水充分溶解，配制成 1μg/μl 溶液。Carrier RNA 溶液应避免反复冻融，冻融次数不能超过 3 次。所以建议在第一次使用时按自己每次的用量分装在 RNase-free 的离心管中后置于-20℃储存。
 - 2) **Carrier RNA 使用方法：**如果起始处理量很少（例如小于 10μl 全血和法医样品），我们推荐使用 Carrier RNA，如果预期有较大量 DNA 产量，用户可以根据需要选择是否加入 Carrier RNA。使用时在每个样品提取所需结合液 CB 中加入 1μl Carrier RNA 储存溶液，将结合液 CB 与 Carrier RNA 溶液充分颠倒混匀即可(结合液 CB 容易起泡沫,请勿使用涡旋振荡混匀)。也可根据样品数量，在总共需要的结合液 CB 中加入总共需要的 Carrier RNA 混匀备用。混合液在室温 24 小时内稳定。
 - 3) **Carrier RNA 加入过多造成 DNA 洗脱液中 Carrier RNA 浓度过高**，下游 PCR 反应可能受干扰，加入过少可能并不能帮助提高 DNA 产量和 PCR 敏感度，因此加入量应该在具体试验中调整以得到最佳效果。
 - 4) 由于 Carrier RNA 本身是小核酸，所以得到的基因组测定 OD260 值会比真实值偏大，建议将得到的基因组直接用 PCR 进行检测。

❖ **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 15ml 漂洗液 WB 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！

1. 血液样品

- a. 取 1-100 μ l 血液到 1.5ml 的离心管中。
- b. 如果不足 100 μ l，加入裂解液 ML 补足到 100 μ l。
- c. 加入 10 μ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入 100 μ l 结合液 CB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70℃放置 10 分钟。

如果处理样品 <10 μ l,建议在 100 μ l 结合液 CB 中加入 1 μ l Carrier RNA 储存溶液。

- d. 冷却后加入 50 μ l 无水乙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，室温放置 3 分钟。

如果周围环境高于 25℃,乙醇需要冰上预冷后再加入。

- e. 接**操作步骤**项下 7。

2. 干血点

- a. 用打孔机打孔的方法在血卡(上面有干血点) 上冲取 3mm(1/8 英寸) 直径血卡小片(上面有干血点),最多将 3 个直径 3mm 血卡小片放入 1.5ml 的离心管中。

一般血液应该点在特定纸或者血卡上面干燥,如 903 paper or IsoCode paper (Schleicher & Schuell), BloodstainCard or FTA Card (Whatman), Guthrie test cards, or comparable blood cards.

- b. 加入 180 μ l 裂解液 ML。
- c. 加入 20 μ l 的蛋白酶 K (20mg/ml)溶液，**立刻涡旋振荡充分混匀**。
- d. 56℃轨道摇床上面 900rpm 振摇 1 小时。

如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者 heating block 上面进行，每 10 分钟

涡旋振荡 10 秒帮助裂解。

e. 加入 200 μ l 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀。

如果只处理一个 3mm 血卡小片，建议在 200 μ l 结合液 CB 中加入 1 μ l Carrier RNA 储存溶液。

f. 70℃轨道摇床上面 900rpm 振摇 10 分钟。

如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者 heating block 上面进行，每 3 分钟涡旋振荡 10 秒帮助裂解。

g. 接操作步骤项下 7。

3. 组织样品

a. 新鲜或者解冻的组织在液氮中研磨成细粉后或者用解剖刀切成小碎块（切成微块可以提高产量）后取<10mg, 转入装有 180 μ l 裂解液 ML 的 1.5ml 离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b. 加入 20 μ l 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 56℃水浴过夜或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

对于小量的组织，一般 4—6 小时即可，但是过夜消化可以得到最佳结果。

d. 加入 200 μ l 结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀。

如果处理样品量少，建议在 200 μ l 结合液 CB 中加入 1 μ l Carrier RNA 储存溶液。

e. 冷却后加 200 μ l 无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置 5 分钟。

如果周围环境高于 25℃,乙醇需要冰上预冷后再加入。

f. 接操作步骤项下 7。

4. 口香糖

- a. 将 30mg 口香糖切成小块放入 1.5ml 离心管，加入 280 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。
- b. 56℃轨道摇床上面 900rpm 振摇至少 3 小时。

如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者 heating block 上面进行，每 10 分钟涡旋振荡 10 秒帮助裂解。

- c. 加入 200 μ l 结合液 CB（加入 1 μ l Carrier RNA），立刻涡旋振荡充分混匀。
- d. 70℃轨道摇床上面 900rpm 振摇 1 小时。

如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者 heating block 上面进行，每 10 分钟涡旋振荡 10 秒帮助裂解。

- e. 冷却后加 200 μ l 无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀。
- f. 最高速（约 14,000rpm）离心 1 分钟，取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 8。

5. 法医材料

- a1. 剪下 1 cm² 烟头或者过滤嘴外层纸，切成 6 小块放入 1.5ml 离心管，加入 300 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤 b。
- a2. 剪下 0.5-2.5 cm² 信封或者邮票，切成小块放入 1.5ml 离心管，加入 300 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤 b。
- a3. 从毛发根部毛囊处开始剪下 0.5-1 cm 长度毛发放入 1.5ml 离心管，加入 280 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)和 20 μ l 1M DTT 溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。接步骤 b。

a4. 将指甲剪成小块放入 1.5ml 离心管，加入 280 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml) 和 20 μ l 1M DTT 溶液，立刻涡旋振荡充分混匀。**接步骤 b。**

a5. 将约 0.5cm² 信封沾染了血液、唾液、精液的材料剪成小块放入 1.5ml 离心管，加入 300 μ l 裂解液 ML 和 20 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml) (如果是精液需另加入 20 μ l 1M DTT 溶液)，立刻涡旋振荡充分混匀。**接步骤 b。**

b. 56℃轨道摇床上面 900rpm 振摇 1 小时。

如果没有可加热轨道摇床，可以在水浴或者 heating block 上面进行，每 10 分钟涡旋振荡 10 秒帮助裂解。

一般毛发 1 小时裂解可以完成，如果不完全可以延长时间。指甲等难裂解物建议过夜裂解。最后没有裂解的不溶物在后续步骤 e 中会通过离心去除。

c. 加入 200 μ l 结合液 CB (加入 1 μ l Carrier RNA)，立刻涡旋振荡充分混匀。

d. 70℃轨道摇床上面 900rpm 振摇 1 小时。

e. 最高速 (约 14,000rpm) 离心 1 分钟，取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。

f. 接操作步骤项下 8。

6. 微切割样品 (包括福尔马林固定的微切割样品)

a. 加入 15 μ l 裂解液 ML 到 0.2 ml 离心管中，放入微切割样品。

b. 加入 10 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

c. 56℃水浴 3 小时 (福尔马林样品 16 小时) 至裂解完全，中间不时颠倒涡旋。

d. 加入 15 μ l 裂解液 ML，再加入 50 μ l 结合液 CB (加入 1 μ l Carrier RNA)，立刻涡旋振荡充分混匀。

e. 冷却后加入 50 μ l 无水乙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，室温放置 5 分钟。

如果周围环境高于 25℃,乙醇需要冰上预冷后再加入。

f. 接操作步骤项下 7。

7. 将上一步混合物（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
8. 加入 500μl 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
9. 加入 500μl 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。
10. 加入 500μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
11. 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。
12. 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 20—50μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热效果更好），室温放置 2-5 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 20μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

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

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
DNA 产量低或者洗脱液中无 DNA	*Carrier RNA 没有加入到结合液 CB- 建议 ：仔细阅读注意事项 4。
	*样品冻融超过 1 次- 建议 ：尽量使用新鲜样品和冻融不超过 1 次的样品。
	*样品在室温放置过久- 建议 ：尽快处理样品或者低温适当方式保存。
	*裂解不完全，蛋白酶 K 失效了- 建议 ：收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。
	*结合液 CB 和 Carrier RNA 没有充分混匀- 建议 ：充分颠倒混匀。
DNA 的下游反应如 PCR 效果不佳	*试剂和样品没有充分混匀- 建议 ：加入每个试剂后都要充分混匀。
	*洗脱效率不高- 建议 ：确保做了步骤 11，否则残留乙醇会影响洗脱效率，仔细阅读步骤 12 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。
	* DNA 产量低或者洗脱液中无 DNA- 建议 ：在下游反应中增加 DNA 用量。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	* 洗脱液中太多或者太少的 Carrier RNA- 建议 ：确定在下游应用中 Carrier RNA 的最大允许量，调整结合液 CB 中加入 Carrier RNA 的用量。仔细阅读注意事项 4。
	* 降低的灵敏度- 建议 ：确定在下游 PCR 应用中 DNA 洗脱液的最大允许用量，减少或者增加 DNA 洗脱液在 PCR 反应中的用量，DNA 洗脱体积也可以相应的调整。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	*离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应- 建议 ：确保做了步骤 11，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- 建议 ：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。
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- 建议 ：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。