

(DP349) 血液基因组 DNA提取试剂盒操作指南 ——中量全血操作流程（1-5 ml血样）

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170328

实验准备

1. 抗凝全血(本实验以5 ml人的抗凝全血为例)
2. 移液器及配套无菌枪头 (2.5 μ l, 10 μ l, 200 μ l, 1ml), 15 ml离心管
3. 无水乙醇, 70%乙醇, 干净的吸水纸
4. 涡旋振荡器, 金属浴/水浴, 台式离心机



Step 1



5 ml抗凝全血中加入
5 ml细胞裂解液CLA



颠倒混匀20次



3,600 rpm($\sim 2,000 \times g$)离心2 min,
倒弃上清

Step 2



加入7.5 ml细胞裂解液CLA，
颠倒混匀20次



3,600 rpm (~2,000 × g)
离心2 min



倒弃上清，将离心管倒置在干净的吸水纸上停留2 min，确保沉淀在管中

此步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖底离心管。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。

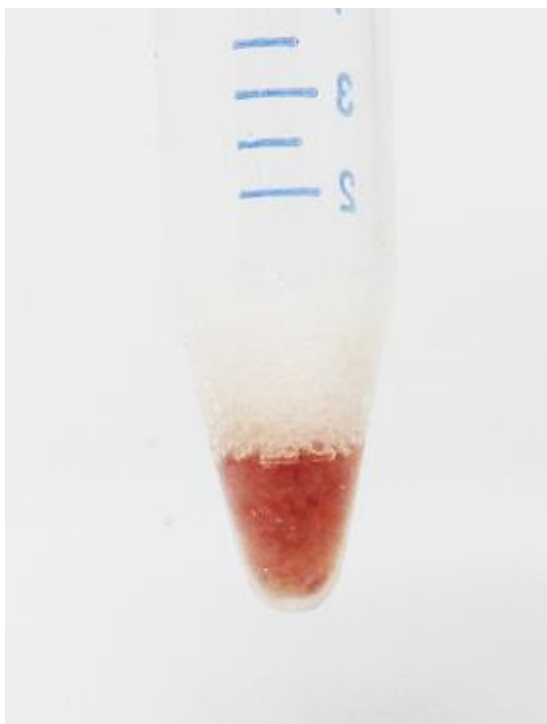
Step 3

按照表1配制缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，此混合液最好现用现配，并在配好后1 h之内用完

表1 不同体积血液所需各种缓冲液用量 (μl)

	血液体积 (μl)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
细胞裂解液CLA	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
缓冲液FGA	67	200	667	2000	3333	6667	13333
Proteinase K	0.5	1.5	5	15	25	50	100
100%异丙醇	67	200	667	2000	3333	6667	13333
70%乙醇	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
缓冲液TB	100	200	200	300	500	1000	1000
补加缓冲液FGA和Proteinase K混合液	10	30	100	300	500	1000	1000

Step 4



加入3.3 ml缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，立即上下剧烈震荡或涡旋混匀至溶液无明显团块。

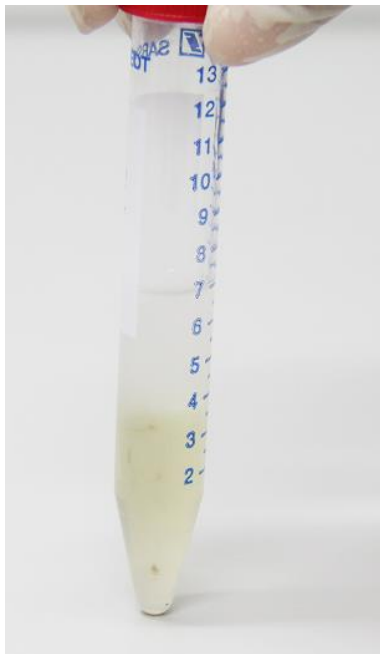
注意：当处理多个样品时，加入缓冲液FGA和Proteinase K的混合液后要立即上下剧烈震荡或涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再混匀。有可能出现痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液FGA和Proteinase K的混合液（具体补加量见表1），再次涡旋混匀。

Step 5

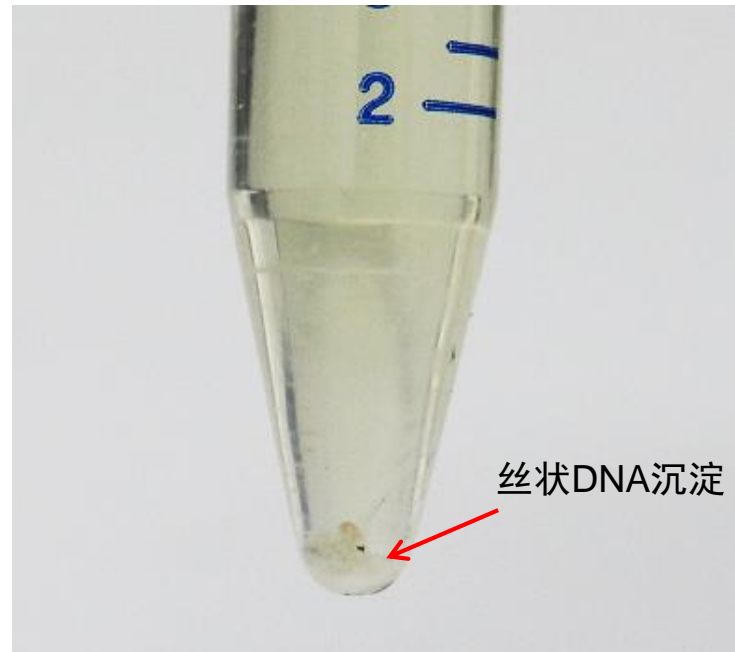


65°C水浴10 min，其间颠倒混匀数次，溶液变清亮

Step 6



加入3.3 ml异丙醇



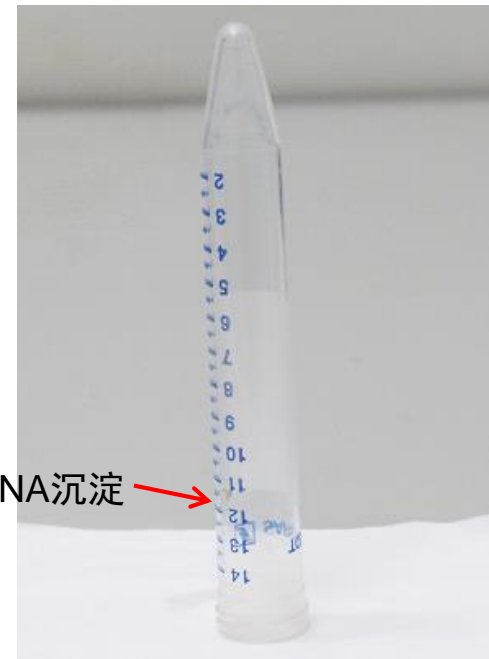
上下颠倒混匀50次至出
现丝状或簇状基因组DNA

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要，一定要充分混匀。

Step 7



3,600 rpm (~2,000 × g) 离心 8 min



倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。如果样品的白细胞数量足够多，可以看到白色的DNA沉淀。

Step 8

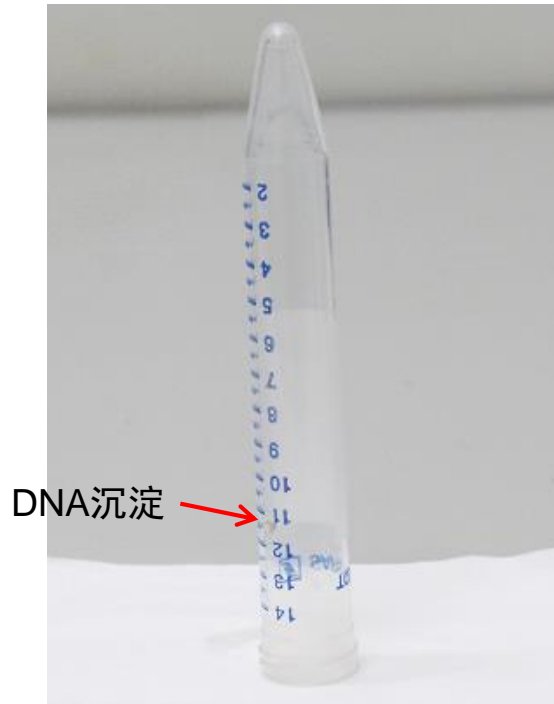


加入5 ml 70%乙醇，涡旋振荡5 sec



3,600 rpm($\sim 2,000 \times g$)离心3 min, 倒弃上清

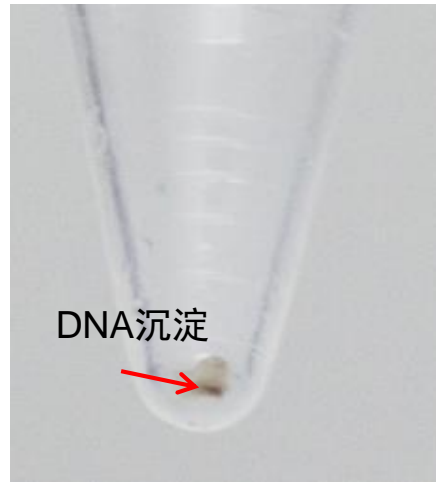
Step 9



将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少5 min，确保沉淀在管中。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁中上清的回流。

Step 10



空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5 min）。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。但是要避免过分干燥DNA沉淀，因为过于干燥的DNA很难溶解。

Step 11



加入500 μ l缓冲液TB，低速涡旋5 sec，65°C加热30 min溶解DNA，其间轻弹数次助溶。

注意：如有难溶性物质存在，可将65°C孵育时间延长至1 h。