

血液基因组 DNA 提取系统(0.1-10 ml)

RelaxGene Blood DNA System

产品信息:

试剂盒组成	保存	DL102-01	DL102-02
		可处理 50ml 血液	可处理 200ml 血液
10x 红细胞裂解液	室温	5ml	20ml
细胞核裂解液	室温	50ml	250ml
蛋白沉淀液	室温	20ml	80ml
DNA 溶解液	室温	30ml	60ml

保存条件: 本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

产品介绍:

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。

产品特点:

1. 质量稳定, 纯度高, 产量高, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.7~1.9, 长度可达 50Kb-150kb, 可直接用于构建文库、PCR、Southern-blot 和各种酶切反应。
2. 试剂盒为溶液型, 可按比例放大缩小体系。

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。
4. 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。
5. 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。

6.不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此产生的个体差异也可能非常大。

7.血液样品反复冻融，会导致提取的 DNA 片段较小、且提取量下降。所得基因组 DNA 也应尽可能避免反复冻融，以免断裂。血液样品的储存：a) 短期保存：已加入抗凝剂的血液样品可在 2-8℃ 储存最多 10 天，对于某些实验例如 Southern 杂交等，需要得到完整全长的基因组 DNA，请将血液样品在 2-8℃ 储存不超过 3 天，此时基因组 DNA 的降解程度较轻。b) 长期保存：已加入抗凝剂的血液请置于 -70℃ 保存(如果提取的是高分子量的 DNA，推荐使用 EDTA 作为抗凝剂)

自备试剂：异丙醇、70%乙醇

操作步骤：

一：小体积全血操作流程：（以 300μl 血液处理量为例）

1.吸取 900μl 1x 红细胞裂解液（需要先稀释到 1x）到一个 1.5ml 离心管。

注意：使用前应该用去离子水将 10x 红细胞裂解液稀释 10 倍到 1x。

2.将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300μl 加到上步装有红细胞裂解液的离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。

3.室温放置 10 min（期间应该颠倒轻弹，混匀数次帮助裂解红细胞）。

4.12,000rpm 离心 20 sec，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。

离心后如果仍看到大量红色细胞团，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 3，4。

5.涡旋振荡 15 sec，重悬、充分分散白细胞团。

6.加入 300μl 细胞核裂解液到重悬的白细胞，**迅速**有力吹打几次混匀，裂解白细胞。由于基因组 DNA 立刻释放出来，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。

如果还有肉眼可见团块，可 65℃ 温育 30-60 min（不要超过一小时）至裂解完全。

7.加入 100μl 蛋白沉淀液后，在**涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 sec**。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。

8.12,000rpm 离心 5 min。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。

9.小心吸取上清（大约 300μl）到一个新的 1.5ml 离心管中。

10.加入等体积的室温异丙醇（300μl），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮

状（丝状）白色 DNA 沉淀。

11.12000rpm 离心 5 min，弃上清。

12.加入 1ml 70%乙醇后，颠倒混匀，12,000rpm 离心 1 min，在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

13.重复操作步骤 12，室温放置数分钟，挥发乙醇。

14.加入 100 μ l DNA 溶解液重新溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 min（不要超过一小时），期间不时的轻弹管壁帮助重新溶解 DNA。也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA。

二、中量全血操作流程（1-10 ml 血样；以 3 ml 血液处理量为例）

1.吸取 9ml 1x 红细胞裂解液到一个 15ml 离心管。

使用前应该用去离子水将 10x 红细胞裂解液稀释 10 倍到 1x。

2.将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 3ml 加到上步装有红细胞裂解液离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。

3.室温放置 10 min（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。

4.2,500 x g 离心 2 min，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 50 μ l 的残留上清。

离心后如果仍看到大量红色细胞团，应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 3，4。

5.涡旋振荡 15 sec，重悬、充分分散白细胞团。

6.加入 3ml 细胞核裂解液到重悬的白细胞，迅速有力吹打混匀，以裂解白细胞。由于基因组 DNA 立刻释放出来，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。

如果还有肉眼可见团块，可 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 min（不要超过一小时）至裂解完全。

7.加入 1ml 蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 sec。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。

8.2,500 x g(可根据需要调整加大离心力)离心 5 min。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。

9.小心吸取上清（大约 3ml）到一个新的 15ml 离心管中。

1. 加入等体积的室温异丙醇（3ml），轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状（丝状）白色 DNA 沉淀。
2. 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（或者 12000rpm 离心 5min，弃上清）。
3. 加入 3ml 70%乙醇后，颠倒混匀，2,000 x g 离心 2-3 min，在管底可以见

到白色的 DNA 沉淀块，倒弃上清。

4. 加入 3ml 70%乙醇，颠倒几次漂洗 DNA 沉淀，2,000 x g 离心 1 min，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。
5. 加入 250 μ lDNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀，轻弹管壁混匀，可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 min（不要超过一小时），也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 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。