

Blood DNA Purification Kit使用指南(Cat.No.:B0008)

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本使用指南，以保证操作正确

实验流程

1. 样品裂解

对于红细胞有细胞核的血液，请参照流程图右侧1B的详细步骤进行操作。



对于哺乳动物血液：
取50 μ l ~ 500 μ l 抗凝血样品加入1.5 ml 离心管中

1000 g 离心1分钟，然后吸去1/2的上清



加入与血液等体积的RCL Buffer，混匀后室温放置5分钟

1000 g 离心1分钟



吸去上清，加入500 μ l Lysis Buffer，吹打充分裂解细胞，并涡旋振荡

2. DNA结合

将裂解产物转移至离心吸附柱中，使DNA吸附在膜上



4000 g 离心1分钟

3. 洗涤

洗柱3次：第1次用Wash Buffer洗，离心，然后用80%的乙醇洗2次



12000 g 离心1分钟

把离心柱转移到新的1.5 ml离心管中，开盖晾干2分钟

4. DNA洗脱

向离心柱中央的膜上加入50 μ l Elution Buffer



室温放置2分钟，12000 g离心1分钟，弃去离心柱

注意：

1. 收集血液样品时，建议用柠檬酸（钠）或EDTA作抗凝剂，不建议用肝素钠作抗凝剂，否则会对实验结果造成明显的影响；
2. Wash Buffer使用前均须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇混匀才可使用；
3. 实验开始前需用灭菌水配制120 ml 80%的乙醇，用于洗涤步骤；
4. 实验开始前需将Elution Buffer提前预热到60°C；
5. DNA提取须在室温进行，提取过程中不可置于冰上。

样品裂解

1A. 对于哺乳动物血液：

a1. 去除血浆：取50 μ l ~ 500 μ l 抗凝血加入1.5 ml离心管中，1000 g（约为实验室常用的小型高速离心机的3500 rpm）离心1分钟（对于冻存的血液，充分融化后按照上述步骤离心。冻存的血液最多不可冻融超过3次，否则无法得到高质量的DNA）。然后小心地用移液器吸去约占血液总体积1/2的上清；

a2. 去除红细胞：向上一部溶液中加入红细胞裂解液（RCL Buffer），其体积与最初的血液体积相同（如果开始使用500 μ l 全血，则RCL Buffer应使用500 μ l），轻柔吹打10次左右混匀，室温放置5分钟；然后进行第2步；

1B. 对于红细胞有细胞核的全血（如鱼类、两栖类、爬行类、鸟类）：取5 ~ 20 μ l 解冻后的抗凝血加入1.5 ml离心管中，加入200 μ l PBS充分混匀；然后进行第2步；

2. 离心：1000 g离心1分钟，用移液器小心地吸去上清（尽量把上清吸干净，并且避免吸走沉淀）；

3. 裂解：向细胞沉淀中加入500 μ l Lysis Buffer，吹打10次以充分裂解细胞；

4. 振荡：用涡旋振荡器高速震荡10秒钟（或用手用力上下振荡离心管使样品变得澄清），以充分裂解细胞。

DNA结合（过柱）

5. 将上述细胞裂解产物转移至DNA离心吸附柱（Spin Column）中，4000 g离心1分钟，弃去收集管中的液体（然后将收集管在吸水纸或卫生纸上倒扣几下吸去管口的液体），将离心柱放回收集管中；

洗涤

6. 加入500 μ l Wash Buffer 到离心吸附柱中，12000 g离心1分钟，弃去收集管中的液体（然后将收集管在吸水纸或卫生纸上倒扣几下吸去管口的液体），将离心柱放回收集管中；

7. 加入500 μ l的80%乙醇到离心吸附柱中，12000 g离心1分钟，弃去液体。用300 μ l的80%乙醇重复洗涤一次（注意：将样品从离心机中取出，以及将离心柱从收集管中取出时，应防止离心柱下部接触到液体从而导致DNA被污染。如果液体不慎接触到离心吸附柱底部，需要弃去液体后空柱离心1分钟以充分去除液体）；

8. 弃去收集管，将离心柱转移至无RNase的1.5 ml EP管中，开盖晾干2分钟。

DNA洗脱

9. 向离心柱中央的膜上加入50 μ l Elution Buffer（可用20 ~ 100 μ l，提前预热到60°C），室温放置2分钟；

10. 12000 g离心1分钟，弃去离心柱，所得的DNA可以进行浓度测量并进行后续实验，或储存于-20°C备用（如需长期保存建议置于-80°C）。

Blood DNA Purification Kit Trouble Shooting

1、DNA纯度不佳。

解决办法:

- a.检查所使用的试剂是否正确加入乙醇，是否受到污染:**
可与未使用过的产品作对照，比较两组结果是否一致。建议试剂盒开封后，每种buffer分装为3~4份（可用15毫升离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。
- b.裂解产物过柱离心后充分弃净液体:** 裂解产物转移至DNA离心吸附柱上4000 g离心后，应倒掉液体并用吸水纸吸净残留在收集管口的液体；后续的洗涤、离心后也应倒掉液体并用吸水纸吸净残留在收集管口的液体。
- C.80%的乙醇洗涤2次后:** 小心地取出离心柱，应严格防止离心柱底部碰到收集管中的液体。如果液体不慎接触到离心柱底部，需要弃去液体后空柱离心1分钟以充分去除液体。

2、DNA得率低于预期。

解决办法:

- a.尽管理论上使用本试剂盒能从100 μ l血液中提取3~6 μ g DNA，然而由于随着血液用量的加大，离心柱的吸附能力逐渐接近上限（约30 μ g），因此该离心柱通常无法提取多于30 μ g的DNA;**
- b.血液样品准备好后应尽快开始进行实验操作，样品不要放置过长时间，以免DNA发生降解;**
- c.对于冰冻保存的血液样品:** 冻融次数不要超过3次，否则提取的DNA质量会大大降低（解冻时应该用37°C水浴或金属浴充分融化）。

产品实测

左图: Blood DNA Purification Kit从50 μ l、100 μ l和200 μ l猪的血液样品（分别为泳道1、2、3）中提取的DNA溶解于50 μ l Elution Buffer中，取5 μ l上样，跑琼脂糖凝胶电泳后的结果。

右图: Blood DNA Purification Kit从200 μ l猪的血液样品中提取的DNA溶解于50 μ l Elution Buffer中，使用Nanodrop测浓度所得的结果。

