AipBest 全血基因组 DNA 快速小量提取试剂盒(离心柱型)

AipBest Whole Blood Genomic DNA Rapid Mini Kit(Centrifugal Column)

使 用 说 明 书

◆目录号：BE201

目录编号	包装单位
BE201-01	50次(带蛋白酶K溶液)
BE201-02	100次(带蛋白酶溶液)
BE201-03	200次(带蛋白酶溶液)

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (BE201-01)	100 次 (BE201-02)	200 次 (BE201-03)
平衡液	室温	5mL	10mL	20mL
缓冲液 BB	室温	10mL	20mL	40mL
结合液 CB	室温	15mL	30mL	60mL
抑制物去除液 IR	室温	25mL	50mL	100mL
漂洗液 WB	室温	13mL	25mL	50mL
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL	15mL	15mL x 2
蛋白酶 K 溶液 (20mg/mL)	4℃或室温	1mL	1mL×2	1mL×4
吸附柱 AC 和 收集管(2mL)	室温	50 套	100 套	200 套

◆适用范围：适用于快速提取全血基因组DNA。

◆产品储存：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. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过 25℃室温至少保存 6 个月，4℃保存 12 个月，－20℃保存 2 年。
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－离心的步骤，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. 操作安全，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. 快速简捷，单个样品操作一般可在 20 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 3-12μg，OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.7～1.9，长度可达 30kb -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 3-12μg 基因组 DNA。

◆**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. 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。
3. 需要自备异丙醇。
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。
6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保批 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 应该保存在－20℃。DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl， 1mM EDTA，pH 8.0)，但是 EDTA 可能下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

◆**关于平衡液的使用：**

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃使沉淀完全消失。

2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100μL 的平衡液至柱子中。13000rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

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

   注：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)。

   注: 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。

2. 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°C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。

平衡液预处理吸附柱备用：使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

3. 冷却后加入 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。

   注：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。

4. 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 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
5. 加入 500μL 抑制物去除液 IR，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。
6. 加入 600μL 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 600μL 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°C水浴中预热效果更好)，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。

注：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. 12,000rpm 离心 20 秒(对于 1.5mL 离心管)或 2,000-3,000rpm 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。

   注：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步骤 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。

   注：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. 现在可以按照操作步骤提取全血基因组 DNA 了。

◆问题与解决方法：

问题	评论与建议
标本中含有血凝块	*不恰当的存放标本，未充分混匀，未使用合适的抗凝剂-**建议:**丢弃有血凝块的标本，重新用 EDTA，肝素，柠檬酸剂收集血液。
红细胞裂解不完全	*血液标本裂解前没有回复到室温-**建议:**处理前先把血液标本回复到室温。 *裂解时间不够-**建议:**可延长裂解时间至 15 分钟以上。 *裂解过程中没有混匀-**建议:**裂解过程中可以更多次颠倒混匀，或者轻弹管壁帮助裂解。
DNA 产量低	*血液标本中本身含有的白细胞数量低-**建议:**增加起始血液处理量。 *血液标本存放时间太长-**建议:**存放在 4℃的血液标本超过 5 天的产量可能大大降低，因此不要存放太久。 *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。 *裂解不完全或者和异丙醇没有充分混匀-**建议:**加入结合液后，和加入蛋白酶 K 后立即吹打或者涡旋混匀; 加入异丙醇后立即吹打

	或者涡旋混匀才加入吸附柱，如果太粘稠必须涡旋振荡 15 秒充分混匀。 *洗脱效率不高-**建议:**确保做了步骤 8，否则残留乙醇会影响洗脱效率，仔细阅读仔细阅读注意事项 6 和步骤 9 和只使用洗脱缓冲液 EB 洗脱。

问题	评论与建议
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 8，乙醇抑制了酶切反应-**建议:**做步骤 8，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。
DNA 长度小于 15kb	*血液样品太老或者不正确的存放，造成 DNA 降解-**建议:**选用新鲜的血液样品。 *操作不当，造成对基因组 DNA 的剪切-**建议:**混匀时不可太剧烈，不可以用手剧烈振荡离心管，选用大口径的枪头转移或者混匀 DNA。
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。
洗脱下来的 DNA 溶液还带有轻微的颜色	*漂洗不完全-**建议:**1.漂洗，直到离心下来的液体没有颜色; 2.将洗脱液当成起始材料，再重复一遍实验，注意略去蛋白酶 K 消化和 70℃孵育步骤。

==========

扫码关注我们