

1ml 血液基因组 DNA 提取试剂盒

一、产品简介

Buffer MG-A 含阳离子多聚物, 能快速裂解细胞, 并且促使长度 > 5 kb 的 DNA 形成容易被沉淀的凝集物; Proteinase K 配合 Buffer GLA 裂解凝集物释放 DNA; 优化的 DNA 结合条件能减少蛋白和盐等杂质的残留。

本试剂盒适合处理 ≤ 1ml 哺乳动物全血, 预期产量为 20-50 µg DNA/ml 血液, 获得的基因组 DNA 长度为 20-30 kb, 无明显的蛋白、盐和乙醇残留, A260/230 ≥ 2.0, 特别适合用于基因芯片、飞行质谱 SNP 分型等分子生物学实验。

本试剂盒特别适合处理陈旧血液和肝素抗凝血液。Buffer MG-A 凝集沉淀 DNA 和 Buffer MGS 洗涤步骤能去除大部分蛋白和绝大部分肝素, 有利于提高 DNA 的纯度。从肝素抗凝血中获得的 DNA, 可满足常规 PCR 的要求。

处理肝素抗凝血液后续用于定量 PCR, 建议购买 Buffer WAK(Cat#NP118), 彻底去除痕量肝素, 避免 PCR 抑制。

处理非抗凝血或出现大量血凝块的抗凝血建议购买 血凝块液化柱(Cat#NP401), 能简化操作过程, 明显提高 DNA 的产量和纯度。

本试剂盒也适合从精液中提取 DNA; 从精斑中提取 DNA 建议使用 痕量 DNA 提取试剂盒(DK803)。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK603-01 (50 次)	DK603-02 (200 次)	原理与用途
Buffer MG-A	125 ml	500 ml	裂解细胞、凝集 DNA
Buffer MGS	60 ml	250 ml	洗涤 DNA 凝集物
Buffer MG-V	15 ml	35 ml	悬浮 DNA 凝集物
Proteinase K*	0.5 ml	1 ml×2	降解蛋白
Buffer GLA	15 ml	60 ml	释放 DNA
Buffer GBH	35 ml	130 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	30 ml	120 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 [§]	16 ml	65 ml	洗涤去除盐
3 ml 吸管	100 个	250 个	分散 DNA 凝集物
DNA 吸附柱-C50	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	50 个×3	200 个×3	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个	接收洗脱的 DNA
TE*	30 ml	60 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

§Buffer WB1: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% Na₃N, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

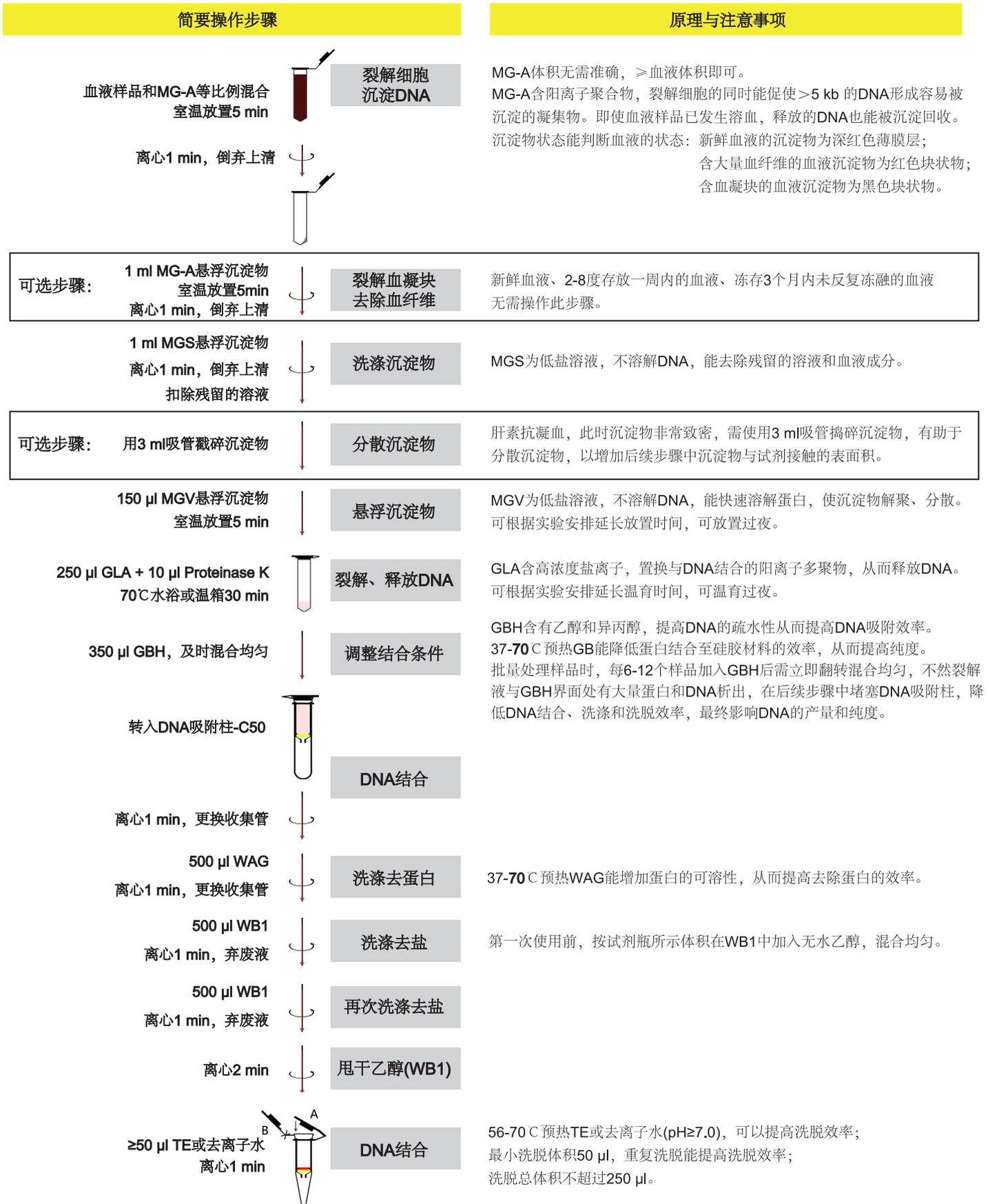
三、注意事项

- 血液样品短期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, 2-8°C 可保存 10 天, 基因组 DNA 完整性和产量随放置时间延长而下降。
- 血液样品长期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, -70°C 保存。使用时应减少反复冻融, 建议在冻存前按所需使用体积分装。
- 冻存血液应在室温或 37°C 缓慢解冻, 不可高温加热, 以免血凝块形成; 将冻存血置于 37°C 摇床中 150-200rpm 融化血液效果最佳, 可减少血凝块的形成。也可以提前一天将血液放在 2-8°C 解冻, 第二天摇晃均匀后恢复至室温。

如样品中出现血凝块, 大部分 DNA 存在于血凝块中, 应吸取血凝块用作 DNA 提取。

- Buffer MG-A、Buffer GLA、Buffer GBH 和 Buffer WAG 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
- 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果, 尤其是 Buffer GBH、Buffer WAG 和添加乙醇后的 Buffer WB1。

四、操作流程示意图



MG-A体积无需准确, \geq 血液体积即可。
MG-A含阳离子聚合物, 裂解细胞的同时能促使 $> 5 \text{ kb}$ 的DNA形成容易被沉淀的凝集物。即使血液样品已发生溶血, 释放的DNA也能被沉淀回收。
沉淀物状态能判断血液的状态: 新鲜血液的沉淀物为深红色薄膜层;
含大量血纤维的血液沉淀物为红色块状物;
含血凝块的血液沉淀物为黑色块状物。

新鲜血液、2-8度存放一周内的血液、冻存3个月内未反复冻融的血液
无需操作此步骤。

MGS为低盐溶液, 不溶解DNA, 能去除残留的溶液和血液成分。

肝素抗凝血, 此时沉淀物非常致密, 需使用3 ml吸管捣碎沉淀物, 有助于分散沉淀物, 以增加后续步骤中沉淀物与试剂接触的表面积。

MGV为低盐溶液, 不溶解DNA, 能快速溶解蛋白, 使沉淀物解聚、分散。
可根据实验安排延长放置时间, 可放置过夜。

GLA含高浓度盐离子, 置换与DNA结合的阳离子多聚物, 从而释放DNA。
可根据实验安排延长温育时间, 可温育过夜。

GBH含有乙醇和异丙醇, 提高DNA的疏水性从而提高DNA吸附效率。
37-70°C预热GB能降低蛋白结合至硅胶材料的效率, 从而提高纯度。
批量处理样品时, 每6-12个样品加入GBH后需立即翻转混合均匀, 不然裂解液与GBH界面处有大量蛋白和DNA析出, 在后续步骤中堵塞DNA吸附柱, 降低DNA结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响DNA的产量和纯度。

37-70°C预热WAG能增加蛋白的可溶性, 从而提高去除蛋白的效率。

第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在WB1中加入无水乙醇, 混合均匀。

56-70°C预热TE或去离子水($\text{pH} \geq 7.0$), 可以提高洗脱效率;
最小洗脱体积50 μl , 重复洗脱能提高洗脱效率;
洗脱总体积不超过250 μl 。

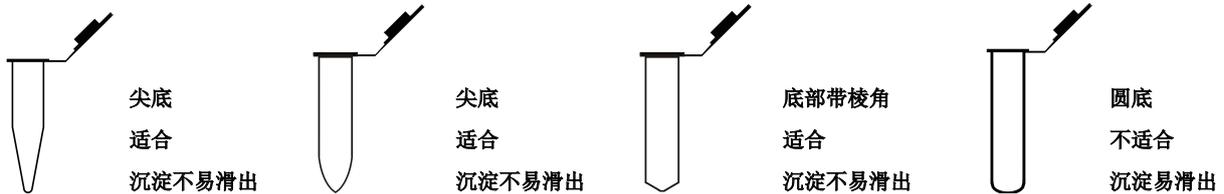
五、实验准备

1. 70℃水浴或温箱；70℃预热 TE 或去离子水 (pH≥7)。
2. Buffer GLA 可能会析出乳白色凝集物，使用前摇晃均匀。
3. 37-70℃预热 Buffer GBH 和 Buffer WAG。
4. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB1 中加入无水乙醇，混合均匀。

六、从 EDTA 和柠檬酸抗凝血中提取 DNA 操作步骤(★为关键步骤)

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm；

需使用尖底或者底部带棱角的 1.5-2 ml 离心管，以免倒弃上清时沉淀物滑出离心管，见下图：



1. 血液和 Buffer MG-A 按 1:1 比例加入离心管中，用力摇晃 20 次，室温放置 5 min；离心 1 min，缓慢倒弃上清。以同样的方式处理完剩余的血液。

已去除血浆的血液，应估算起始全血体积，按比例调整起始血液用量。通常 500 μl 去除血浆的血液相当于 1 ml 全血。

★ 如此步骤发现样品中有大量血凝块（倒弃溶液时沉淀物易滑落），建议按八、使用血凝块液化柱从血凝块中提取 DNA 操作步骤操作。

2. 可选步骤：样品含少量血凝块或含有大量血纤维时，需操作此步骤。

加入 1 ml Buffer MG-A，用力摇晃 20 次，室温放置 5 min，离心 1 min，缓慢倒弃上清。

3. 加入 1 ml Buffer MGS，用力摇晃 20 次。离心 1 min，缓慢倒弃上清，在吸水纸上扣除残留的溶液。

4. 加入 150 μl Buffer MGv，用力摇晃 20 次，室温放置 5 min。

5. 加入 250 μl GLA 和 10 μl Proteinase K，用力摇晃 20 次；置于 70℃水浴或温箱 30 min，温育期间至少剧烈摇晃混合 1 次。

延长温育时间不影响使用效果，如温育过夜，温度设为 65℃。

为方便操作，可事先将 Buffer GLA 和 Proteinase K 按比例混合；两者混合后需 1 小时内使用完。

- ★ 6. 加入 350 μl 37-70℃预热的 Buffer GBH，用力摇晃 20 次混合均匀（！请勿离心），转入 DNA 吸附柱-C50(置于收集管)。

批量处理样品时，每 6-12 个样品加入 Buffer GBH 后需立即翻转混合均匀，不然裂解液与 Buffer GBH 界面处有大量蛋白和 DNA 析出，在后续步骤中堵塞 DNA 吸附柱，降低 DNA 结合、洗涤和洗脱效率，最终影响 DNA 的产量和纯度。

7. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管中。

8. 加入 500 μl 37-70℃预热的 Buffer WAG，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管。

9. 加入 500 μl Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C50 放回收集管。

10. 重复步骤 9。

11. 离心 2 min。

12. 将 DNA 吸附柱-C50 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加 ≥50 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，室温放置 1-2min，离心 1 min。

在硅胶膜的中央再加入 ≥50 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，重复洗脱；洗脱总体积不可超过 250 μl。

▲ 56-70 预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

▲ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥7.0。

七、从精液中提取 DNA

将 100-500 μl 精液置于 1.5 ml 尖底离心管中，12,000~15,000×g 离心 2 min，缓慢倒弃上清。

继续六、从 EDTA 和柠檬酸抗凝血中提取 DNA 操作步骤 3。

八、使用血凝块液化柱从血凝块中提取 DNA 操作步骤(★为关键步骤)

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温 12,000×g；如离心机转速只能设定为 rpm，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

血凝块液化柱(Cat#NP401)：置于 2 ml 离心管，最大柱体积为 900 μl，同个样品可重复使用。

1. 将≤900 μl 非抗凝血转入血凝块液化柱中，离心 2 min；丢弃血凝块液化柱。

常见的非抗凝采血管为金色盖子，含分离胶；需去除血清和分离胶。底层血液包括血凝块和未凝固的血液成分，绝大部分 DNA 存在于血凝块中。

为了方便后续操作，建议按图示去除未凝固的血液成分，将血凝块转入血凝块液化柱中。通常，金色盖子的采血管中血凝块的体积≤900 μl。

如果只取部分血液用于 DNA 提取，建议用 3-5 ml 吸管戳碎血凝块，吸取样品转入血凝块液化柱中。

★如抗凝血中出现血凝块，绝大部分 DNA 存在于血凝块中，应取血凝块用作 DNA 提取。



2. 在滤液中加入 1 ml Buffer MG-A 用力摇晃 20 次，悬浮沉淀物，室温放置 5 min；离心 1 min，缓慢倒弃上清。

3. 加入 1 ml Buffer MG-A，用力摇晃 20 次，室温放置 5 min，离心 1 min，缓慢倒弃上清。

4. 加入 1 ml Buffer MGS，用力摇晃 20 次。离心 1 min，缓慢倒弃上清，在吸水纸上扣除残留的溶液。

5. 加入 150 μl Buffer MG-V，用力摇晃 20 次，室温放置 5 min。

6. 加入 250 μl GLA 和 10 μl Proteinase K，用力摇晃 20 次；置于 70℃ 水浴或温箱 30 min，温育期间至少剧烈摇晃混合 1 次。

延长温育时间不影响使用效果，如温育过夜，温度设为 65℃。

为方便操作，可事先将 Buffer GLA 和 Proteinase K 按比例混合；两者混合后需 1 小时内使用完。

7. 实验准备：在干净的 1.5 ml 离心管中加入 350 μl Buffer GBH，开盖；

将 DNA 吸附柱-C50 置于收集管，做好标记，开盖；

将移液器调整为 800-900 μl。

8. 步骤 6 的样品离心 1 min；

吸取离心上清，转入步骤 7 准备的 1.5 ml 离心管，缓慢吹打 3 次，将溶液转入步骤 7 准备的 DNA 吸附柱-C50。

9. 离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管中。

10. 加入 500 μl 37-70℃ 预热的 Buffer WAG，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管。

11. 加入 500 μl Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C50 放回收集管。

12. 重复步骤 11。

13. 离心 2 min。

14. 将 DNA 吸附柱-C50 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加≥50 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，室温放置 1-2min，离心 1 min。

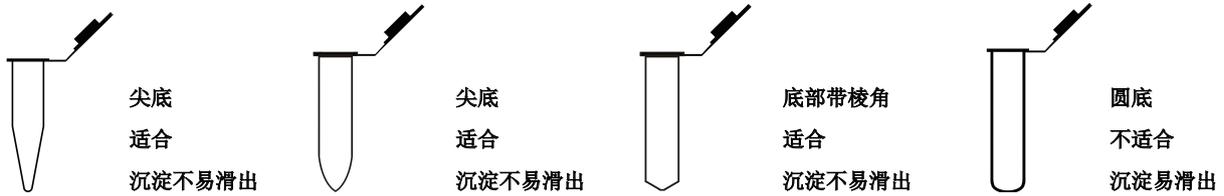
在硅胶膜的中央再加入≥50 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，重复洗脱；洗脱总体积不可超过 250 μl。

▲ 56-70℃ 预热 TE 或者去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

▲ 如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至≥7.0。

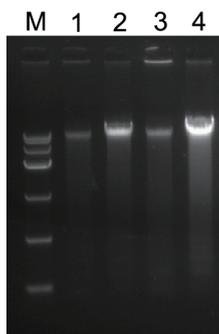
九、从肝素抗凝血中提取 DNA 操作步骤(★为关键步骤)

所有离心参数为使用台式快速离心机, 室温 $12,000\times g$; 如离心机转速只能设定为 rpm, 设定为低于最高转速 1,000 rpm;
需使用尖底或者底部带棱角的 1.5-2 ml 离心管, 以免倒弃上清时沉淀物滑出离心管, 见下图:



- 血液和 Buffer MG-A 按 1:1 比例加入离心管中, 用力摇晃 20 次, 室温放置 5 min; 离心 1 min, 缓慢倒弃上清。以同样的方式处理完剩余的血液。已去除血浆的血液, 应估算起始全血体积, 按比例调整起始血液用量。通常 500 μ l 去除血浆的血液相当于 1 ml 全血。
- 可选步骤: 样品为血凝块或含有大量血纤维时, 需操作此步骤。
用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 20 次), 丢弃吸管; 加入 1 ml Buffer MG-A, 用力摇晃 20 次, 室温放置 5 min, 离心 1 min, 缓慢倒弃上清。
- 用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 20 次), 丢弃吸管; 加入 1 ml Buffer MGS, 剧烈摇晃 20 次, 离心 1 min, 倒弃上清, 在吸水纸上扣除残留的溶液。
- ★ 用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 20 次), 丢弃吸管; 加入 150 μ l Buffer MG-V, 剧烈摇晃 20 次, 室温放置 5 min。
- 加入 250 μ l GLA 和 10 μ l Proteinase K, 剧烈摇晃 20 次; 置于 70 $^{\circ}$ C 水浴或温箱 30 min, 温育期间至少剧烈摇晃混合 1 次。
延长温育时间不影响使用效果, 如温育过夜, 温度设为 65 $^{\circ}$ C。
为方便操作, 可事先将 Buffer GLA 和 Proteinase K 按比例混合; 两者混合后需 1 小时内使用完。
- ★ 加入 350 μ l 37-70 $^{\circ}$ C 预热的 Buffer GBH, 剧烈摇晃 20 次混合均匀 (! 请勿离心), 转入 DNA 吸附柱-C50(置于收集管)。
批量处理样品时, 每 6-12 个样品加入 Buffer GBH 后需立即翻转混合均匀, 不然裂解液与 Buffer GBH 界面处有大量蛋白和 DNA 析出, 在后续步骤中堵塞 DNA 吸附柱, 降低 DNA 结合、洗涤和洗脱效率, 最终影响 DNA 的产量和纯度。
- 离心 1 min, 将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管中。
- 加入 500 μ l 37-70 $^{\circ}$ C 预热的 Buffer WAG, 离心 1 min, 将 DNA 吸附柱-C50 转入另一个干净的收集管。
- 可选步骤: 如提取的 DNA 后续用于定量 PCR, 建议操作此步骤, 需单独购买 Buffer WAK(Cat#NP118)。
加入 500 μ l Buffer WAK, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-C50 放回收集管。
- 加入 500 μ l Buffer WB1, 离心 1 min, 弃废液, 将 DNA 吸附柱-C50 放回收集管。
- 重复步骤 10。
- 离心 2 min。
- 将 DNA 吸附柱-C50 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 向硅胶膜的中央加 ≥ 50 μ l TE 或去离子水(pH ≥ 7.0), 室温放置 1-2min, 离心 1 min。
在硅胶膜的中央再加入 ≥ 50 μ l TE 或去离子水(pH ≥ 7.0), 重复洗脱; 洗脱总体积不可超过 250 μ l。
 - ▲ 56-70 $^{\circ}$ C 预热 TE 或者去离子水(pH ≥ 7.0), 可以提高洗脱效率。
 - ▲ 如果使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。

十、实验示例

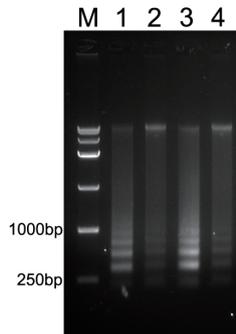


←图 1：使用血凝块液化柱处理非抗凝血

M: DL15,000 0.8%agarose

- 1 和 2 为同一份样品；
3 和 4 为同一份样品；
1 和 3 未使用血凝块液化柱
2 和 4 使用血凝块液化柱

样品	浓度(ng/μl)	260/280	260/230
1	33.5	1.74	1.92
2	66.9	1.82	2.16
3	66.3	1.77	2.1
4	184.7	1.85	2.29



←图 2：DK603 与同类产品平行处理血凝块，

M: DL15,000 0.8%agarose

- 1 和 2 为同一份样品；
3 和 4 为同一份样品；
1 和 3 使用同行公司同类产品
2 和 4 使用 DK603

样品	浓度(ng/μl)	260/280	260/230
1	40.2	1.88	1.47
2	41.4	1.82	2.21
3	52.8	1.86	1.83
4	46.4	1.83	2.64

十一、常见问题解答

Q1 本试剂盒适合处理肝素抗凝的血液吗？

A1 适合。Buffer MG-A 凝集沉淀 DNA 时，已去除绝大部分肝素，可满足常规 PCR 的要求。

如后续用于定量 PCR，建议购买 Buffer WAK(Cat#NP118)，操作九、9。

Q2 本试剂盒能否回收 >250 bp 的 DNA 片段和线粒体 DNA？

A2 Buffer MG-A 能凝集沉淀 >5kb 的 DNA，小片段 DNA 不能被有效回收；哺乳动物的线粒体 DNA 约为 16 kb 能被有效回收。

Q3 DNA 产量低，而且纯度低

A3.1 操作步骤1，起始样品量偏少：分离血浆时吸除白膜层，血液沉降后未混合均匀只吸取红细胞层，出现血凝块的样品未吸取血凝块用作DNA提取。

A3.2 加入Buffer GBH后未及及时翻转混合均匀，裂解液与Buffer GBH界面处有大量蛋白和DNA析出，在后续步骤中堵塞DNA吸附柱，降低DNA结合、洗涤和洗脱效率，最终影响DNA的产量和纯度。