

## 2ml 血液基因组 DNA 提取试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒采用硅胶膜选择性吸附DNA的方法回收DNA。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 1-2 ml 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。

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。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK604-01 (50 次)	DK604-02 (200 次)	原理与用途
Buffer MG-A	250 ml	500 ml×2	裂解细胞、凝集 DNA
Buffer MGS	60 ml	250 ml	洗涤 DNA 凝集物
Buffer MGV	15 ml	60 ml	悬浮 DNA 凝集物
Proteinase K*	1 ml	1 ml×4	降解蛋白
Buffer GLA	30 ml	60 ml×2	释放 DNA
Buffer GBH	35 ml	130 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	30 ml	60 ml×2	洗涤去除蛋白
Buffer WB1 <sup>§</sup>	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-C100	50 个	200 个	选择性吸附 DNA
收集管	50 个×2	200 个×2	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	120 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%NaN<sub>3</sub>, 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。
- 操作步骤 7**，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。

#### 四、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。

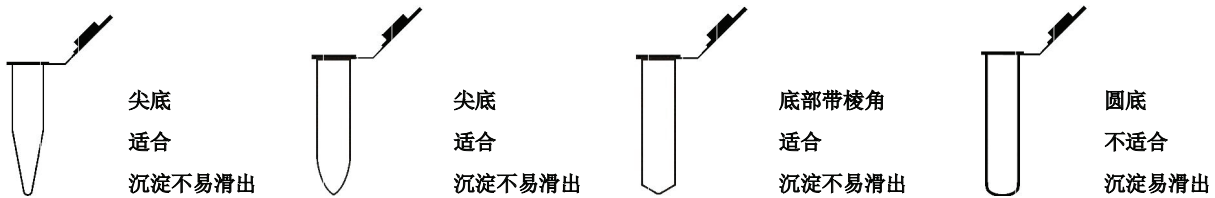
#### 五、使用 1.5-2 ml 离心管操作步骤(★为关键步骤)

处理少量样品，建议使用此操作步骤。

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；

台式快速离心机通常 10 秒内可达最高转速/离心力；如使用慢升速离心机，离心时间需延长 30 秒。

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，剧烈摇晃 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 1 ml 去除血浆的血液相当于 2 ml 全血。

2. 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。

加入 1 ml Buffer MG-A，剧烈摇晃 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，剧烈摇晃 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. 可选步骤：样品为肝素抗凝血液时，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。

5. 加入 250 μl Buffer MG-V，剧烈摇晃 20 次，室温放置 5 min。

6. 加入 450 μl GLA 和 20 μl Proteinase K，剧烈摇晃 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. 加入 600 μl 37-70℃预热的 Buffer GBH，剧烈摇晃 20 次混合均匀（！请勿离心）。

批量处理样品时，每 6-12 个样品加入 Buffer GB 后需立即翻转混合均匀，不然裂解液与 Buffer GB 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。

8. 将溶液分两次(每次 600-750 μl)转入 DNA 吸附柱-C100(置于收集管中)，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C100 放回收集管中。

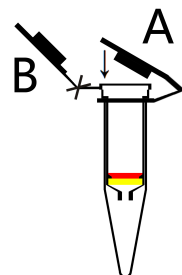
9. 加入 500 μl 37-70℃预热的 Buffer WAG，离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-C100 放入另外一个干净的收集管中。

10. 加入 500 μl Buffer WB1，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C100 放回收集管中。

11. 重复步骤 10。

12. 离心 2 min。

13. 将 DNA 吸附柱-C100 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加 ≥ 75 μl TE 或去离子水 (pH ≥ 7.0)，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。室温放置 1-2 min 或更长时间，离心 1 min。



在硅胶膜的中央再加入 ≥ 75 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。

## 六、使用 10-15 ml 离心管操作步骤(★为关键步骤)

批量处理样品，建议使用此操作步骤。需使用尖底的 10-15ml 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 10-15 ml 尖底离心管，剧烈摇晃 20 次，室温放置 5 min；室温 2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。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 1 ml 去除血浆的血液相当于 2 ml 全血。

2. 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 10 次)，加入 1 ml Buffer MG-A，吹捏 3 ml 吸管 10 次，将 3 ml 吸管中溶液吹打入离心管中，丢弃 3 ml 吸管；室温放置 5 min，室温 2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。

3. 用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 10 次)，加入 1 ml Buffer MGS，吹捏 3 ml 吸管 10 次悬浮沉淀物，将 3 ml 吸管中溶液吹打入离心管中，丢弃 3 ml 吸管。室温 2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。

★4. 用 3 ml 吸管仔细吸除回流的溶液，捣碎沉淀物(反复戳 10 次)，保留 3 ml 吸管在离心管中。

5. 加入 250 μl Buffer MGJ，吹捏 3 ml 吸管 10 次，室温放置 5 min。

6. 加入 450 μl GLA 和 20 μl Proteinase K，吹捏 3 ml 吸管 10 次，保留 3 ml 吸管在离心管中。

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. 置于 70℃ 水浴 30 min；温育期间吹捏 3 ml 吸管 10-30 次。

应打开水浴锅盖，避免冷凝水滴入离心管中。

8. 将溶液全部吸入 3 ml 吸管中，加入 600 μl Buffer GBH，吹捏 3 ml 吸管 10 次混合均匀。

9. 分两次(每次 600-750 μl)转入 DNA 吸附柱-C100(置于收集管中)，室温 12,000×g 离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C100 放回收集管中。

10. 加入 500 μl 37-70℃ 预热的 Buffer WAG，室温 12,000×g 离心 1 min，弃收集管，将 DNA 吸附柱-C100 放入另外一个干净的收集管中。

11. 加入 500 μl Buffer WB1，室温 12,000×g 离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C100 放回收集管中。

12. 重复步骤 11。

13. 室温 12,000×g 离心 2 min。

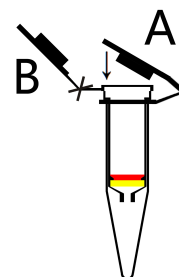
14. 将 DNA 吸附柱-C100 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，向硅胶膜的中央加 ≥ 75 μl TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)。

室温放置 1-2min 或者更长时间，室温 12,000×g 离心 1 min。

在硅胶膜的中央再加入 ≥ 75 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、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，已去除肝素。

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，哺乳动物的线粒体 DNA 约为 16 kb 能被有效回收；小片段 DNA 不能被有效回收。

Q3 最后获得的 DNA 的长度只有 20-30 kb？试剂是否会造成 DNA 降解？

A3 基因组 DNA 为线性长链状，能与硅胶材料多点结合，后续的离心过程中因机械力而发生断裂成为 20-30 kb 的片段；但可以满足 PCR 等常规的实验。

## 八、使用 10-15 ml 离心管操作流程示意图

