

## 体液 DNA 微量提取试剂盒

### 一、产品简介

采用独特的细胞裂解液 Buffer GL, 配合蛋白酶 K 裂解细胞释放 DNA; Buffer GBS 调整 DNA 结合条件, 释放的 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上。

适合处理 200  $\mu$ l 样品, 包括血浆、血清、腹水、组织间隙液、培养细胞上清等, 不适合处理肝素抗凝的血液中分离的血浆。

优化的 DNA 结合条件, 无需添加 Carrier RNA, 能有效回收长度大于 50 个碱基的双链或者单链 DNA, 包括病毒 DNA、细胞破裂后释放的基因组 DNA。获得的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

本试剂盒使用 DNA 吸附柱-C4 回收 DNA, 最大吸附量为 4  $\mu$ g DNA, 最小洗脱体积为 10  $\mu$ l。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK605-01(50 次)	原理与用途
Proteinase K*	1 ml	降解蛋白
Buffer GL	15 ml	释放 DNA
Buffer GBS	30ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAG	30 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB2 <sup>§</sup>	16 ml	洗涤去除盐
DNA 吸附柱-C4	50 个	吸附 DNA
收集管	50 个×2	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	接收洗脱的 DNA
TE*	15 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	

\*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。

§Buffer WB2: 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, pH 8.0(25°C)。

所有组成成分于室温储存。

### 三、注意事项

1. Buffer GL、Buffer GBS 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。
2. 每次使用前需用力摇晃 Buffer GBS 试剂瓶, 悬浮其中的介质。
3. 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 GBS、Buffer WAG 和添加了乙醇的 Buffer WB2。

### 四、实验准备

1. 56°C 水浴或温箱; 56°C 预热 TE 或者去离子水 (pH $\geq$ 7)。
2. Buffer GL 可能会析出乳白色凝集物, 需 56°C 加热溶解, 或使用前摇晃均匀。
3. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇, 混合均匀。

## 五、操作步骤

所有离心时间按使用台式快速离心机设定，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。

所有离心条件为室温，12,000-16,000×g；如离心机只能设定转速，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

### 1. 在干净的 1.5 ml 离心管中加入 200 μl 体液样品。

如果处理多个样品并且起始样品体积不同，可以用去离子水或者 TE 将样品体积调整一致。

### 2. 加入 20 μl Proteinase K 和 200 μl Buffer GL，Vortex 震荡 10 秒或剧烈摇晃 20 次混合均匀，置于 56℃ 水浴；水浴 4-5 min 后，以同样的方式震荡或者摇晃混合一次，继续水浴 4-5 min。

▲ 为方便操作，可事先将 Proteinase K 和 Buffer GL 按照 1:10 的比例预混；两者混合后需 1 小时内使用完。

### 3. 用力摇晃 Buffer GBS 试剂瓶悬浮其中的基质，需在 20 分钟内完成加样，不然需再次悬浮；

在步骤 2 的样品中加入 400 μl Buffer GBS，翻转离心管 10 次混合均匀-----! 请勿离心（包括简短离心）

### 4. 将溶液转入 DNA 吸附柱-C4(置于收集管中)，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-C4 转入另一个干净的收集管中。

### 5. 加入 500 μl Buffer WAG，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C4 放回收集管中。

### 6. 加入 700 μl Buffer WB2，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-C4 放回收集管中。

### 7. 加入 100 μl Buffer WB2，离心 2 min。

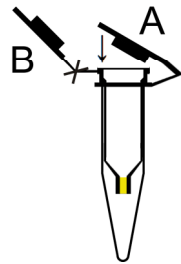
### 8. 将 DNA 吸附柱-C4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 ≥10 μl TE 或去离子水(pH≥7.0)，

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)。

离心 1 min。

▲ 56℃ 预热 TE 或去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

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



## 六、常见问题解答

### Q1 为什么本试剂盒不适合处理肝素抗凝的血液中分离的血浆？

A1 肝素是高度带负电荷的酸性黏多糖，在硅胶材料吸附 DNA 的条件下，也能结合到硅胶材料上；在最后洗脱时能与 DNA 一起洗脱下来。肝素会抑制 PCR 和酶切等大部分酶反应。

### Q2 提取的 DNA 无法电泳检测观察

A2 琼脂糖凝胶电泳使用 EB 染色检测的下限是 10 ng DNA，而且是电泳后分布于细窄范围内的双链 DNA。例如，残留的 Carrier RNA 使 A260 明显升高，但无法电泳观察具体带型。

体液中游离 DNA 或病毒 DNA 含量极少，例如正常人循环血中获得的游离 DNA 的量小于 10 ng/ml，无法通过电泳检测到。

### Q3 提取的 DNA 进行 PCR 效率很低，甚至无 PCR 产物

A3 一般 PCR 反应体系中游离镁离子浓度为 0.7 mM，试剂盒携带的 TE 含 0.1 mM EDTA，EDTA 能螯合镁离子，降低游离镁离子浓度。

使用 TE 洗脱 DNA，加入 PCR 体系的体积超过 1/2 可能会因 EDTA 螯合镁离子而抑制 PCR。建议使用 pH ≥ 7 的去离子水或将 TE 用去离子水稀释 10 倍后作为洗脱液。