

96 痕量血液 DNA 提取试剂盒

一、产品简介

本试剂盒专门为从痕量人或哺乳动物血液中提取 DNA 而设计, 适合处理的样品为血液和各种介质上的干血点(包括滴于纱布或滤纸等吸水材质的干血点、涂抹于墙壁或滴于地面的干血点等); 起始血量为 1-50 μ l 血液, 用户可根据血液浸润面积估算实验所需干血点面积, 例如滤纸材质的采血卡起始样品为 1~3 片 3 \times 3 mm 干血点。

方法简单、方便: 优化的裂解液配合蛋白酶 K 最大程度释放 DNA, 调结合条件(无需添加 Carrier RNA), 释放的 DNA 被选择性吸附到硅胶膜上, 漂洗去除抑制物和盐, 低盐溶液洗脱 DNA。获得的 DNA 可直接用于 PCR、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

本试剂盒使用 96 DNA 吸附板-T10 回收 DNA, 完全避免个别孔可能被堵塞的情况, 确保样品提取的均一性, 最小洗脱体积为 25 μ l, 最大洗脱总体积为 140 μ l。

处理部分样品需单独订购 96 过滤板-N: 干燥于滤纸、纸巾、衣物等介质的血液, 介质在水溶液中易分散。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK801-96-2 (2 \times 96)	原理与用途
Proteinase K*	1 ml \times 2	降解蛋白
Buffer TD1	120 ml	裂解细胞、释放 DNA
Buffer TD2	60 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer WAF	120 ml	洗涤去除蛋白和抑制物
Buffer WB2 [§]	65 ml	洗涤去除盐
96 DNA 吸附板-T10	2 块	选择性吸附 DNA
96 深孔板 (2.2 ml)	8 块	接收废液
96 U 型板	2 块	接收洗脱的 DNA
不干胶片	8 张	密封 96 孔板
TE ^{**}	30 ml	洗脱 DNA
说明书	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 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, 0.025%NaN₃, pH 8.0(25 $^{\circ}$ C)。

所有组成成分于室温储存。

三、注意事项

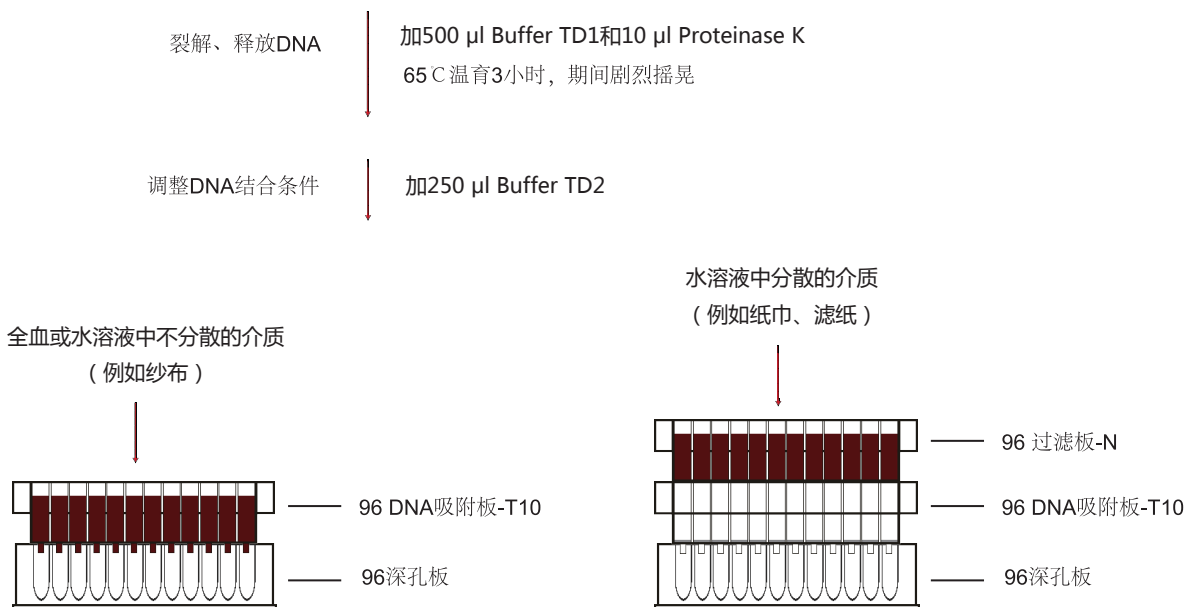
1. Buffer TD1、Buffer TD2 和 Buffer WAF 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果, 尤其是 Buffer WAF 和添加了乙醇的 Buffer WB2。

四、实验准备

1. 65 $^{\circ}$ C 水浴或温箱; 65 $^{\circ}$ C 预热 TE 或去离子水 (pH \geq 7)。
2. 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。

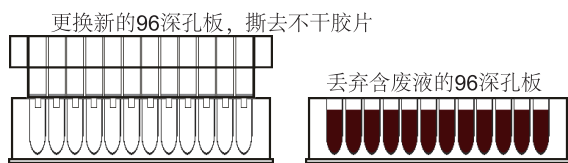
五、操作流程示意图

1-50 μ l的人或哺乳动物血液或干血点



用吸水纸擦去上平面可能残留的溶液；贴上不干胶片。

离心10 min



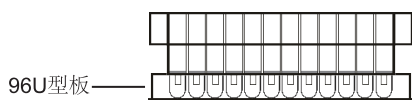
洗涤去抑制物 | 加500 μ l Buffer WDS，离心10 min

洗涤去除蛋白 | 加500 μ l Buffer WAF，离心10 min
更换新的96深孔板

洗涤去盐 | 加500 μ l Buffer WB2，离心5 min

洗涤去盐 | 加500 μ l Buffer WB2，离心5 min
更换新的96深孔板

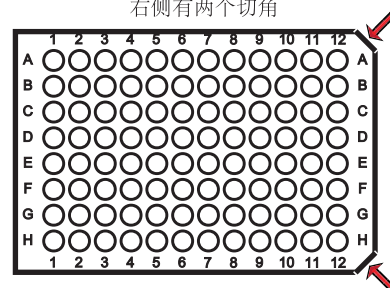
甩干乙醇 | 离心10 min



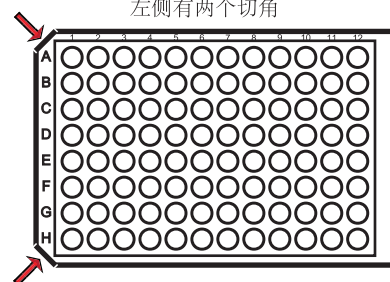
洗脱DNA | 加25-140 μ l 56-70 $^{\circ}$ C 预热的TE或去离子水(pH \geq 7.0)
离心5 min。

用不干胶片封口
或者将DNA转入保存管

96 DNA吸附板-C15俯视图
右侧有两个切角



96 U型板俯视图
左侧有两个切角



六、操作步骤

所有离心条件为：吊篮式水平转子，室温 2,500×g；如果离心力偏低，不利于溶液滤过，最终获得的 DNA 有明显的蛋白、盐和乙醇残留；如果

离心力偏高，塑料耗材可能会变形甚至破裂。计速为 rpm 的离心机，按公式计算所需转速：

$$\text{转速(rpm)} = \frac{15007}{\sqrt{R}} \quad R \text{ 为转子半径, 单位 cm.}$$

如果吊篮式水平转子底部不平整，应在底部垫上合适尺寸、平整的铁板或者塑料板。

1. 在干净的 1.5 -2 ml 离心管中加入起始血量为 1-50 μl 的人或哺乳动物血液或干血点；

适合处理的干血点包括滴于纱布、滤纸或纸巾等吸水材质的干血点、涂抹于墙壁或滴于地面的干血点等；

用户可根据血液浸润面积估算实验所需血点面积，比如滤纸材质的采血卡起始样品为 1~3 片 3×3 mm 干血点。

2. 加入 **10 μl Proteinase K** 和 **500 μl Buffer TD1**，用力摇晃 20 次，将离心管底部立于水平面轻轻敲打，使样品浸没在溶液中；

置于 65℃ 水浴或温箱 3 小时，温育期间至少摇晃混合 2 次，延长不影响使用效果，可温育过夜-----温育时间较长，请合理安排时间

如纱布、滤纸或纸巾等吸水材质体积较大，应适当增加 Buffer TD1 用量，保证介质完全浸没在 Buffer TD1 中。操作步骤 4 应按比例调整试剂用量：

Buffer TD1/ Buffer TD2= 2/ 1。

3. 耗材组装

全血、水溶液中不分散的介质：将 **96 DNA 吸附板-T10** 置 **96 深孔板** 上；

水溶液中分散的介质，例如吸水纸、纸巾等：从下到上为 **96 深孔板--96 DNA 吸附板-T10--96 过滤板-N**（！请注意编号方向）

（96 过滤板-N 需单独订购）

4. 调整结合条件

Buffer TD2 用量为 1/2 Buffer TD1 体积。

加入 250 μl Buffer TD2，温和翻转离心管 2 次或缓慢吹打 2 次混合均匀，按编号顺序将溶液转入步骤 2 准备的 **96 DNA 吸附板-T10** 或 **96 过滤板-N**。

如使用 96 过滤板-N，溶液完全滤过后丢弃 96 过滤板-N。

如果 **96 DNA 吸附板-T10** 上平面沾染溶液，用干净的吸水纸擦干，贴上不干胶片。

！加入 Buffer TD2 后混合方式应温和，避免产生大量气泡；转入 96 孔板前请勿离心，包括简短离心。

！转移溶液时避免交叉污染。

5. 将 **96 DNA 吸附板-T10** 连同 **96 深孔板** 放入吊篮式水平转子，离心 10 min；将 **96 DNA 吸附板-T10** 转入另外一块干净的 **96 深孔板**，撕去不干胶片。

6. 每孔加入 **500 μl Buffer WDS**，离心 10 min。

7. 每孔加入 **500 μl Buffer WAF**，离心 10 min；将 **96 DNA 吸附板-T10** 转入另外一块干净的 **96 深孔板**。

8. 每孔加入 **500 μl Buffer WB1**，离心 5 min。

9. 每孔加入 **500 μl Buffer WB1**，离心 5 min；将 **96 DNA 吸附板-T10** 转入另外一块干净的 **96 深孔板**。

10. 离心 10 min。

11. 将 **96 DNA 吸附板-T10** 按照编号方向转入 **96 U 型板**，每孔加入 25-140 μl 56-70℃ 预热的 TE 或去离子水 (pH≥7.0)，离心 5 min。

加入洗脱液体积为 25-100 μl ，需将洗脱液准确加在硅胶膜中央；加入洗脱液体积为 100-140 μl ，无需注意加样的位置。

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。

再次加入 ≥25 μl TE 或去离子水洗脱，可以提高洗脱效率。但洗脱总体积不可超过 140 μl ，不然 96 DNA 吸附板-T10 底部会接触液面。