

# (DP349) 血液基因组 DNA提取试剂盒操作指南 ——中量全血操作流程（1-5 ml血样）

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170328

# 实验准备

1. 抗凝全血(本实验以5 ml人的抗凝全血为例)
2. 移液器及配套无菌枪头 (2.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1ml), 15 ml离心管
3. 无水乙醇, 70%乙醇, 干净的吸水纸
4. 涡旋振荡器, 金属浴/水浴, 台式离心机



# Step 1



5 ml抗凝全血中加入  
5 ml细胞裂解液CLA



颠倒混匀20次



3,600 rpm( $\sim 2,000 \times g$ )离心2 min,  
倒弃上清

## Step 2



加入7.5 ml细胞裂解液CLA，  
颠倒混匀20次



3,600 rpm (~2,000 × g)  
离心2 min



倒弃上清，将离心管倒置在干净的吸水纸上停留2 min，确保沉淀在管中

此步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖底离心管。

注意：在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁上清的回流。

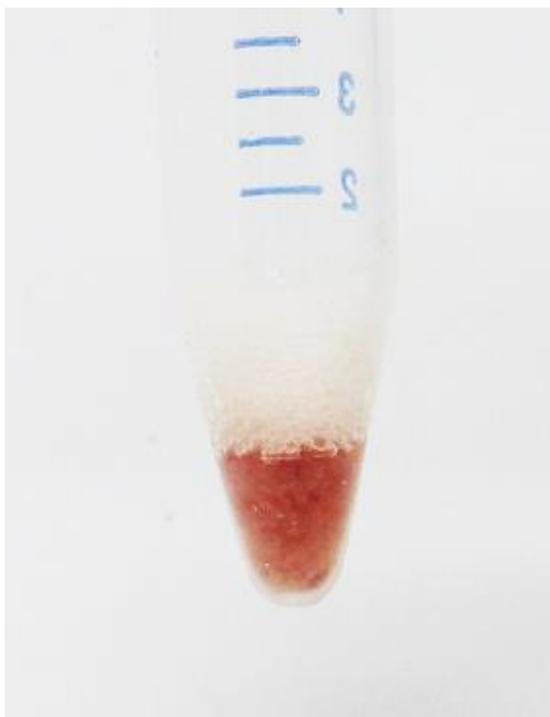
## Step 3

按照表1配制缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，**此混合液最好现用现配，并在配好后1 h之内用完**

表1 不同体积血液所需各种缓冲液用量 (μl)

	血液体积 (μl)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
细胞裂解液CLA	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
缓冲液FGA	67	200	667	2000	3333	6667	13333
Proteinase K	0.5	1.5	5	15	25	50	100
100%异丙醇	67	200	667	2000	3333	6667	13333
70%乙醇	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
缓冲液TB	100	200	200	300	500	1000	1000
补加缓冲液FGA和Proteinase K混合液	10	30	100	300	500	1000	1000

## Step 4



加入3.3 ml缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，立即上下剧烈震荡或涡旋混匀至溶液无明显团块。

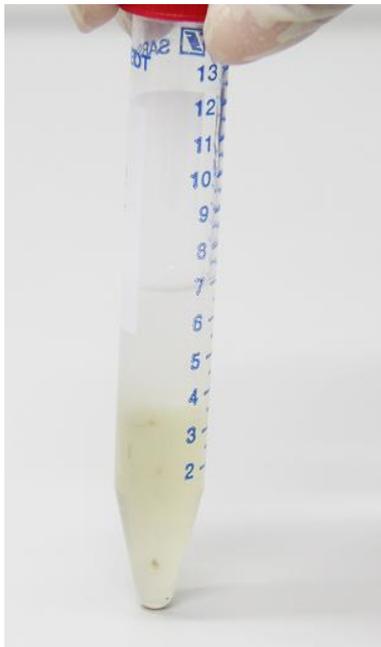
注意：当处理多个样品时，加入缓冲液FGA和Proteinase K的混合液后要立即上下剧烈震荡或涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再混匀。有可能出现痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液FGA和Proteinase K的混合液（具体补加量见表1），再次涡旋混匀。

## Step 5

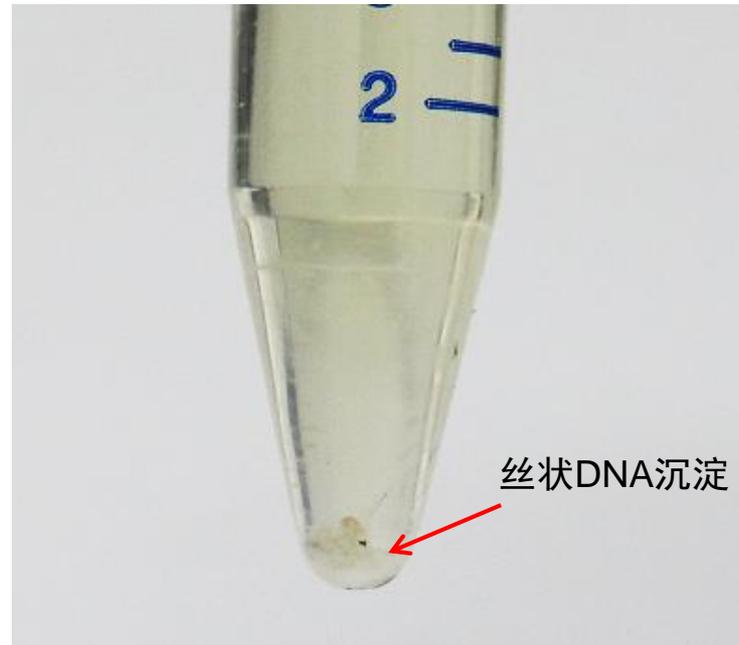


65°C水浴10 min，其间颠倒混匀数次，溶液变清亮

## Step 6



加入3.3 ml异丙醇



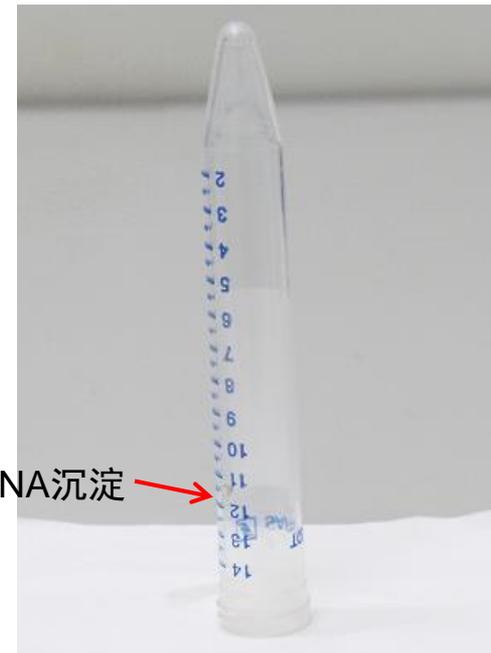
上下颠倒混匀50次至出  
现丝状或簇状基因组DNA

**注意：**与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要，一定要充分混匀。

## Step 7



3,600 rpm (~2,000 × g) 离心 8 min



倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。

**注意：**在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。如果样品的白细胞数量足够多，可以看到白色的DNA沉淀。

## Step 8



加入5 ml 70%乙醇，涡旋振荡5 sec



3,600 rpm( $\sim 2,000 \times g$ )离心3 min, 倒弃上清

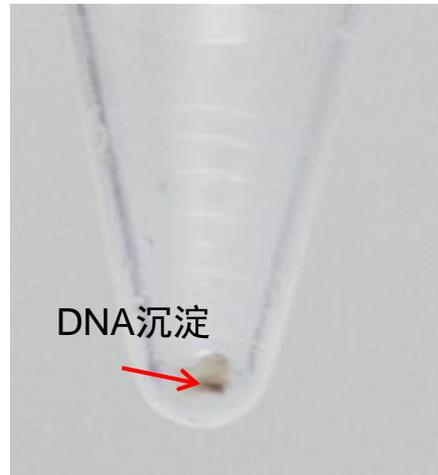
## Step 9



将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少5 min，确保沉淀在管中。

**注意：**在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁中上清的回流。

## Step 10



空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5 min）。

**注意：**乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。但是要避免过分干燥DNA沉淀，因为过于干燥的DNA很难溶解。

## Step 11



加入500  $\mu$ l缓冲液TB，低速涡旋5 sec，65°C加热30 min溶解DNA，其间轻弹数次助溶。

**注意：**如有难溶性物质存在，可将65°C孵育时间延长至1 h。