



(DP349) 血液基因组 DNA提取试剂盒操作指南 ——小体积全血操作流程 (<math><600\ \mu\text{l}</math>血样)

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170327

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 抗凝全血(本实验以300 μ l人的抗凝全血为例)
2. 移液器及配套无菌枪头 (2.5 μ l , 200 μ l , 1ml) , 1.5 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



备注：本实验以人血为例，如提取哺乳动物全血可以用此流程，如果禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，红细胞有核细胞，因此处理量为5-20 μ l，当处理血样为血凝块，可选择液化柱CX1 (TIANGEN, RK165) (需自备) 对血凝块进行液化处理。

实验准备-试剂盒准备

使用前先在漂洗液PWB中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。



Step 1



300 µl全血



加入750 µl细胞裂解液CLA,
颠倒混匀20次

Step 2



12,000 rpm (~11,500 × g)
离心1 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200 μ l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团块。

注意：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。

Step 6



加入200 μ l异丙醇



上下颠倒混匀50次，
可能会出至出丝状或簇状基
因组DNA，也有可能看不到

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



12,000 rpm (~13,400 × g) 离心 5 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。

如看不到沉淀（由于纯度较高沉淀呈透明状，难以观察），请小心倒掉上清，继续后续实验。

Step 8



加入300 μ l 70%乙醇，涡旋振荡5 sec



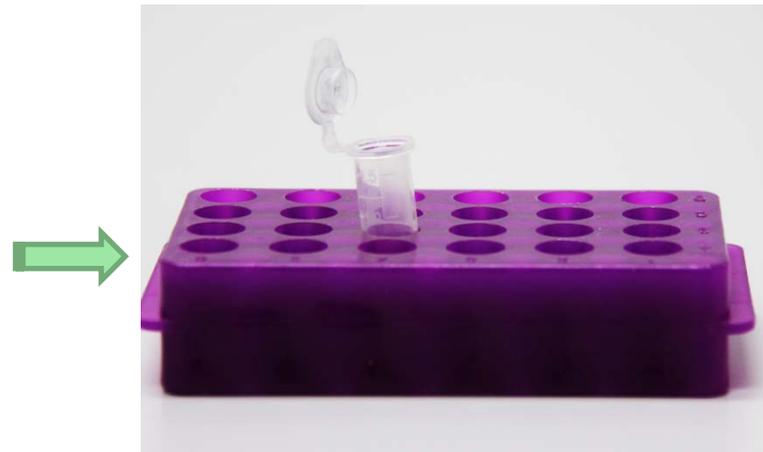
12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min,

Step 9



小心倒弃上清，确保沉淀在管中。将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少5 min。

Step 10

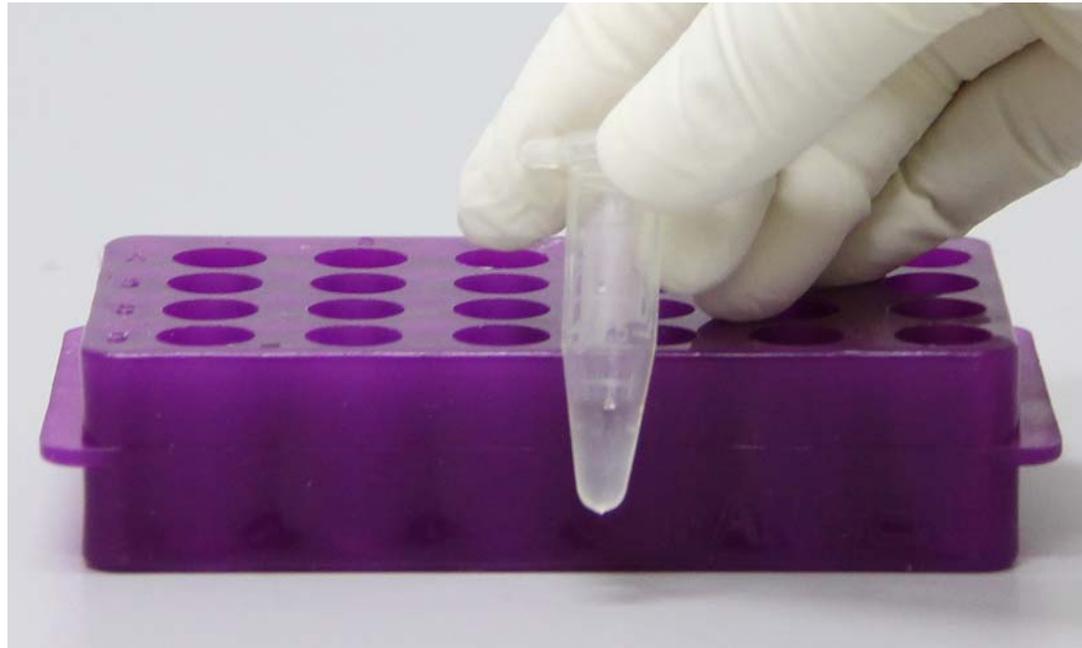


空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5 min）。

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。

如看不到沉淀（由于纯度较高沉淀呈透明状，难以观察），请小心倒掉上清，继续后续实验。

Step 11



加入200 μ l缓冲液TB，低速涡旋5 sec，65°C加热20 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。