

## Blood DNA Extraction Mini Kit

### 血液 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从血液、培养细胞、唾液、拭子保存液等液体样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

#### 产品组份

产品编号	DNB301-01	DNB301-02	DNB301-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Extraction Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer MBL	3 ml	20 ml	80 ml
Buffer W1A	4.4 ml	13 ml	66 ml
Buffer W2A	5 ml	20 ml	2 x40 ml
Proteinase K	220 $\mu$ l	1.1 ml	5.5 ml
Buffer EB	1.5 ml	10 ml	60 ml

## 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 12 个月。低温下, Buffer MBL 可能会有沉淀形成, 需 55℃水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 可室温保存 1 年, 长期保存需保存于-20℃。

## 准备事项

- 水浴锅
- Buffer W1A 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

### A. 抗凝血液样品

1. 转移 250µl 血液样品及 20ul Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。

若样品超过 250ul, 加入 3 倍体积红细胞裂解液, 颠倒数次混匀, 静置 3 分钟。之后 2000×g 离心 5 分钟, 倒弃上清液, 吸尽残液留下白细胞沉淀。向沉淀中加入 250ul PBS 或灭菌水涡旋打散样品, 之后加入 20µl Proteinase K, 进行下一步操作。

2. 加入 250µl Buffer MBL 至离心管中, 颠倒混匀充分, 高速涡旋 15 秒。70℃水浴 10 分钟。按过柱纯化进行操作。

该步骤必须涡旋混匀, 若未涡旋混匀即加热会导致提取的 DNA 产量及纯度大大下降。

### B. 培养细胞的消化裂解(不超过 $5 \times 10^6$ )

1. 计算细胞数量。2,000 x g 离心 5 分钟收集细胞, 小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 250µl PBS 和 20µl Proteinase K 至样品中。涡旋 10 秒重悬细胞。
3. 加入 250µl Buffer MBL 至细胞重悬液中, 充分颠倒混匀, 高速涡旋 15 秒。70℃水浴 10 分钟。按过柱纯化进行操作。

### C. 液体样品(拭子保存液样品、唾液、胸水等)

1. 在 1.5ml 离心管中, 加入 20µl Proteinase K。
2. 加入 250µl 样品, 加入 250µl Buffer MBL 至样品中, 涡旋混匀 15 秒。70℃水浴 10 分钟。
3. 按过柱纯化进行操作。

## 过柱纯化

4. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。

处理 DNA 丰富的样品，加入乙醇时会有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。

5. 把 gDNA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。转移混合液(包括沉淀)至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

若柱子出现堵塞，14,000  $\times$  g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 $\mu$ l，分次过柱。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。

7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。

8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30 $\mu$ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量。血液用量不得超过 1ml。
- **样品消化不充分：**延长 Proteinase K 消化时间。
- **样品裂解不充分：**样品与 Buffer MBL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer MBL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer MBL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 12,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分：**延长消化时间让样品充分消化。
- Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。