

# 血液基因组 DNA 提取系统 (0.1~20 ml) (非离心柱型)

## RelaxGene Blood DNA System



### 产品信息:

产品组成	DL132-01 (可处理 50 ml 血液)	DL132-02 (可处理 200 ml 血液)
细胞裂解液 CLA(Buffer CLA)	125 ml	2×250 ml
缓冲液 FGA(Buffer FGA)	40 ml	160 ml
洗脱缓冲液 TB(Buffer TB)	30 ml	60 ml
Proteinase K	250 μl	1 ml

### 储存条件:

该试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下, 可保存 12 个月, 更长时间的保存可置于 2-8°C。2-8°C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在 37°C 水浴中预热 10 min, 以溶解沉淀。

### 产品简介:

本试剂盒采用独特的缓冲液系统, 提取 0.1-20 ml 加入各种抗凝剂的新鲜血液和冻存血液样品基因组 DNA。本缓冲液系统可最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质污染。提取的基因组 DNA 片段大, 产量高, 纯度好, 稳定可靠。

本试剂盒避免使用苯酚、氯仿等有机溶剂, 回收的 DNA 可适用于各种常规操作, 如酶切、PCR、文库构建、Southern Blot 等实验。

提取得率（根据血液样品中白细胞数量的不同，DNA 产量会有所差异）

材料	保存时间	提取量	DNA 产量	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>
人类全血	4°C一周	300 μl	3-10 μg	1.7 - 1.9
人类全血	4°C一周	1 ml	4-30 μg	1.7 - 1.9
人类全血	4°C一周	5 ml	100-200 μg	1.7 - 1.9
人类全血	4°C一周	10 ml	200-400 μg	1.7 - 1.9

### 产品特点：

量大质优：提取 0.1-20 ml 各种血液，可获得多达 2-400 μg 高纯度 DNA。

安全可靠：无苯酚、氯仿等有机溶剂的污染。

价廉物美：与同类产品相较，性价比高，纯化得到的 DNA 样品可长期保存。

**注意事项：请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。**

- 血液样品反复冻融，会导致提取的 DNA 片段较小、且提取量下降。所得基因组 DNA 也应尽可能避免反复冻融，以免断裂。
- 血液样品的储存：
  - 短期保存：已加入抗凝剂的血液样品可在 2-8°C 储存最多 10 天，对于某些实验例如 Southern Blot 等，需要得到完整全长的基因组 DNA，请将血液样品在 2-8°C 储存不超过 3 天，此时基因组 DNA 的降解程度较轻。
  - 长期保存：已加入抗凝剂的血液请置于 -70°C 保存（如果提取的是高分子量的 DNA，推荐使用 EDTA 作为抗凝剂）
- 所有离心操作均可在室温下完成。

### 一、小体积全血操作流程（<600 μl 血样；以 300 μl 血液处理量为例）

1. 向 300 μl 抗凝剂的血液中加入 750 μl 细胞裂解液 CLA，颠倒混匀 20 次。

**注意：**为方便与离心机配套使用，可加入与血液等体积的细胞裂解液 CLA，重复裂解两次。

2. 12,000 rpm (~13,400×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。

3. 按照表 1 配制缓冲液 FGA 与 Proteinase K 的混合液。

**注意：**此混合液最好现用现配，并在配好后 1 h 之内用完。

4. 加入 200 μl 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：**当处理多个样品时，加入缓冲液 FGA 和 Proteinase K 的混合液后要立刻涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再混匀。有可能出现大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。

5. 65°C 水浴 10 min，其间颠倒混匀数次。

6. 加入 200 μl 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，应该仔细观察。

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。

**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。

8. 加入 300 μl 70% 乙醇，涡旋振荡 5 sec，12,000 rpm (~13,400×g)，离心 2 min，倒弃上清。

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上清的回流。

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。

11. 加入 200  $\mu\text{l}$  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 1h。

## 二、中量全血操作流程（1-10 ml 血样；以 5 ml 血液处理量为例）

1. 向 5 ml 含抗凝剂的血液中加入 5 ml 细胞裂解液 CLA，颠倒混匀 20 次，3,600rpm( $\sim 2,000\times g$ )离心 2 min，倒弃上清；
2. 再向其中加入 7.5 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，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。

3. 按照表 1 配制缓冲液 FGA 与 Proteinase K 的混合液。

注意：此混合液最好现用现配，并在配好后 1 h 之内用完。

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。有可能出现大量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液 FGA 与 Proteinase K 的混合液（具体补加量见表 1），再次涡旋混匀。

5. 65°C 水浴 10-30 min，其间颠倒混匀数次。

6. 加入 3.3ml 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，应该仔细观察。

7. 3,600 rpm( $\sim 2,000\times g$ )，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。

- 8.加入 5 ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 sec，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 3 min，倒弃上清。
- 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上清的回流。**
- 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。**
- 11.加入 500 μl 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：如果使用少量的缓冲液 TB 溶解 DNA，孵育时间可能需要延长。**

### 三、大量全血操作流程（10-20 ml 血样；以 10 ml 血液处理量为例）

#### 1.处理样品：

a) 离心富集有核细胞进行核酸提取：将血样 3,600 rpm(~2,000×g)，离心 15-20 min，抽弃血浆，取中间白膜层细胞加入到 15 ml 离心管中，加入 10 ml 细胞裂解液 CLA，涡旋混匀 10 sec，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 2 min，倒弃上清。再加入 15 ml 细胞裂解液 CLA，涡旋混匀 10 sec，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 2 min，倒弃上清。

b) 细胞裂解液 CLA 处理血液标本分次富集有核细胞进行核酸提取：在 15 ml 离心管中添加细胞裂解液 CLA 和血液样本（比例 2.5:1），多次富集进行下游实验。

（例 10 ml 全血处理方式：在两个 15 ml 离心管中分别加入 5 ml 的全血和 10 ml 细胞裂解液 CLA，涡旋混匀 5 次，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 3 min，倒弃

上清；再向其中加入 2.5 ml 细胞裂解液 CLA，涡旋混匀 10 sec，混合到一支离心管里，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 3 min，倒弃上清；进行下游操作。）

**注意：**细胞裂解液 CLA 处理步骤应小心操作，为避免沉淀被倒出，推荐使用尖底离心管。在极少情况下细胞裂解液 CLA 处理得到的沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。

2.按照表 1 配置缓冲液 FGA 与 Proteinase K 的混合液，对于 10-20 ml 的全血标本，每个样品需要 6.7 ml 缓冲液 FGA 与 Proteinase K 工作液。

**注意：**此混合液最好现用现配，并在配好后 1 h 之内用完。

3.加入 6.7 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。有可能出现大量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加 1 ml 缓冲液 FGA 和 Proteinase K 的混合液，再次涡旋混匀。

4.65°C水浴 30 min，其间颠倒混匀数次。

**注意：**随着蛋白的消解，溶液的颜色从红色变为黄绿色。

5.加入 6.7 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，应该仔细观察。

6.3,600 rpm(~2,000×g)，离心 10 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：**如果得到的团块过于松弛，可以延长离心时间或者增大离心力。

7.加入 10ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 sec，3,600 rpm(~2,000×g)，离心 3 min，倒弃上清。

**注意：**如果得到的团块过于松弛，可以延长离心时间或者增大离心力。

8.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。

9. 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。

10.加入 1 ml 缓冲液 TB，低速涡旋 5 sec，65°C加热 1 h 溶解 DNA，其间轻弹数次助溶。

**注意：**如果使用少量的缓冲液 TB 溶解 DNA，孵育时间需要延长。

	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

**表 1 不同体积血液所需各种缓冲液用量(μl)**

BM190311