

Biomarker Blood/Cell/Tissue DNA Kit

◆ 产品介绍

利用特殊的结合液/蛋白酶K迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶，在高离子盐状态下，使基因组DNA选择性吸附于离心柱内硅基质膜；利用抑制物去除液和漂洗液，经过漂洗—离心，将细胞代谢物、蛋白等杂质去除；最后利用低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组DNA从硅基质膜上洗脱。

本试剂盒使用硅胶柱纯化方式，提取过程中无需使用酚氯仿等有毒试剂，也无需进行耗时的醇类沉淀，并最大限度的去除RNA、杂蛋白、脂类及其他抑制性杂质。

◆ 试剂盒组成

试剂盒组成	保存	50次
平衡液	室温	5 ml
裂解液TL	室温	11 ml
缓冲液BB	室温	10 ml
结合液CB	室温	15 ml
抑制物去除液IR	室温	25 ml
漂洗液WB	室温	13 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液EB	室温	15 ml
蛋白酶K溶液20mg/ml	4℃或者室温	1 ml
吸附柱AC	室温	50个
收集管 (2ml)	室温	50个

本试剂盒可在室温储存12个月不会影响使用效果

◆ 储存事项:

- 1.裂解液TL、结合液CB、抑制物去除液IR低温时可能出现析出和沉淀，可以在37℃水浴几分钟帮助其重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- 2.蛋白酶K保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过25℃室温至少保存6个月，4℃保存12个月，-20℃保存2年。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中发生挥发、氧化、pH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

注意事项：

- 1.漂洗液WB第一次使用前加入52ml的无水乙醇；
- 2.所有的离心均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机；
- 3.需要自备1xPBS、异丙醇和RNase A（可先看不同样本类型操作步骤）；
- 4.不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此其产量的个体差异也可能非常大；
- 5.开始实验前将需要的水浴先预热到70℃备用；
- 6.为了最佳效果，最好使用新鲜血液样本或者4℃存放少于3天的其他组织样本，不要使用反复冻融超过3次的样本，否则会严重降低产量。

关于平衡液的使用

- 1.介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应，而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力，从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。
- 2.平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至37℃使沉淀完全消失。
- 3.使用方法：（临用前才预处理）取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取100 μl的平衡液至柱子中13000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中

废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕，接后续的操作步骤。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

平衡液预处理吸附柱备用：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”。

1.全血

a.取200ul新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，放入1.5ml离心管。

如果全血起始量小于200 μ l，则用缓冲液BB补足到200 μ l。如果起始量介于200 μ l-300 μ l之间，则后续操作需要按照比例增加试剂用量。如果起始量介于300 μ l-1ml之间，则需要先进行红细胞裂解操作(见本说明书后附录)。

如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量5-20 μ l，可加缓冲液BB补足到200 μ l后进行后续步骤。

b.加入20 μ l蛋白酶K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入200 μ l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在70℃放置10分钟，期间每隔3min颠倒混匀3-5次。溶液应变清亮（但颜色偏黑色）。

可选步骤，一般不需要: 如果RNA残留较多，需要去除RNA，可以在加入200 μ l结合液CB前加20 μ l RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。

c.冷却后加100 μ l异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量，必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。

d.将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

e.接操作步骤项下5。

2.组织培养细胞

a.收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个1.5ml离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。

b.13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。弃上清，留下细胞团和大约10-20 μ l残留的液体。

c.加200 μ l 1xPBS重悬洗涤细胞，13,000rpm离心10秒，使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，将细胞沉淀重悬于180 μ l 1xPBS中。

d.加入20 μ l蛋白酶K (20mg/ml)溶液，充分混匀，再加入200 μ l结合液CB，立刻涡旋振荡充分混匀，在70℃放置10分钟。

可选做步骤: 如果RNA残留较多，需要去除RNA，可以在加入200 μ l结合液CB前加20 μ l RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。

e.冷却后加100 μ l异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

f.将上一步混合物（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱AC中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm离心60秒，倒掉收集管中的废液。

g.接操作步骤项下5。

3.动物组织（例如鼠肝脑）

a.将20-50mg新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有180 μ l组织裂解液TL的1.5ml离心管中，用大口径枪头吹打混匀。

b.加入20 μ l的蛋白酶K溶液(20mg/ml)，立刻涡旋振荡充分混匀。

c.将裂解物放置在55℃水浴1-3小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤: 如果RNA残留较多，需要去除RNA，可在完成步骤c后加20 μ l RNase A(25mg/ml)溶液，振荡混匀，室温放置5-10分钟。

d. 12,000rpm离心60秒，将上清液转入新的2.0ml干净的离心管中。该步骤吸取上清液时尽量不要吸到不溶物，以免堵塞离心柱。

e.加入200 μ l 结合液CB, 立刻涡旋振荡充分混匀, 70°C放置10分钟, 期间每隔3min颠倒混匀3-5次。

f.冷却至室温后加100 μ l 异丙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。

g.用1ml的枪头吸取混合物, 将混合物加入一个吸附柱AC中, (吸附柱放入收集管中) 13,000rpm离心60秒, 倒掉收集管中的废液。

h.接操作步骤项下5。

4.特殊动物组织 (鼠尾)

a.将0.2-0.5cm的鼠尾巴尖(即20-50mg)剪碎 (一定要剪0-2cm范围内的尾巴尖, 否则裂解效果不好), 或者在液氮中研磨组织成细粉后, 转入装有180 μ l 组织裂解液TL的1.5ml离心管中, 用大口径枪头吹打混匀。

b.加入20 μ l的蛋白酶K(20mg/ml), 立刻涡旋振荡充分混匀。

c.将裂解物放置在55°C水浴3小时或者直到组织消化完全, 期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

可选做步骤: 如果RNA残留较多, 需要去除RNA, 可在完成步骤c后加20 μ l RNase A(25mg/ml)溶液, 振荡混匀, 室温放置5-10分钟。

d.用一个1ml不带针头的一次性输液器抽打裂解物2-3次。

e.12,000rpm离心60秒, 将上清液转入新的2.0ml干净的离心管中。

f.加入200 μ l 结合液CB和100 μ l 异丙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀。

g.13,000rpm 离心5分钟, 将上清加入一个吸附柱AC中, (吸附柱放入收集管中) 13,000rpm离心30-60秒, 倒掉收集管中的废液。

h.接操作步骤项下5。

上述步骤中立刻涡旋或者吹打充分混匀非常重要, 混匀不充分严重降低产量, 必要时如样品粘稠不易混匀时可以涡旋振荡15秒混匀。

5.加入500 μ l 抑制物去除液IR, 12,000rpm 离心30秒, 弃废液。

6.加入600 μ l 漂洗液WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。

7.加入600 μ l 漂洗液WB, 12,000rpm 离心30秒, 弃掉废液。

8.将吸附柱AC放回空收集管中, 13,000rpm离心2分钟, 去除干净漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

9.取出吸附柱AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位垂直悬空加100 μ l 洗脱缓冲液EB (洗脱缓冲液事先在65-70°C水浴中预热), 室温放置3-5分钟, 12,000rpm 离心1分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置2分钟, 12,000rpm离心1分钟。洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要DNA浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于50 μ l, 体积过小降低DNA洗脱效率, 减少DNA产量。

10.DNA可以存放在2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在-20°C。

附录 (以300 μ l, 1ml全血举例红细胞裂解操作):

1.吸取900 μ l 红细胞裂解液到一个1.5ml离心管或者3ml红细胞裂解液到一个15ml离心管。

2.将抗凝全血 (使用前回复到室温) 颠倒混匀后, 吸取300 μ l 全血和1ml全血分别加到上述1.5ml和15ml离心管中, 颠倒6-8次, 并倒置轻弹管壁,

确保充分混匀。

3.室温放置10分钟 (期间应该颠倒轻弹混匀数次, 帮助裂解红细胞)。

4.12,000 rpm离心20秒 (对于1.5ml离心管) 或2,000-3,000 rpm离心5分钟 (对于15ml离心管), 倒弃红色上清, 并小心的尽可能多的吸弃上清 (注意不要吸到管底的细胞团), 留下完整的管底白细胞团和大约10 μ l 的残留上清。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团, 也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起, 但是如果看到的是大部分的红色细胞团, 说明红细胞裂解很不充分, 应该再加入红细胞裂解液重悬细胞团后重复3, 4。

5.加入200 μ l 缓冲液BB涡旋振荡重悬白细胞团, 充分分散白细胞团。

其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬, 影响后续实验裂解效果, 建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。

6.现在可以按照操作提取全血基因组DNA了。