

Version: AA 3.2 (2021.04.01修订)

SPARKclassic Blood DNA Kit

大量全血基因组DNA提取试剂盒

(溶液型)

目录号: AA1104

01/产品组分

序号	组分	16 次×10 mL AA1104-A	32 次×10 mL AA1104-B
1	10×红细胞裂解液	50 mL	100 mL
2	细胞核裂解液	180 mL	180 mL×2
3	蛋白沉淀液	55 mL	110 mL
4	DNA 溶解液	15 mL	30 mL

02/保存条件

所有组分均室温（15-25℃）保存。

03/产品概述

本试剂盒适用于快速提取各种动物全血基因组 DNA，可在 1 h 内完成单个或多个样本的提取工作。本试剂盒根据全血特点采用几个快速步骤提取基因组 DNA。首先红细胞裂解液裂解去除不含 DNA 的红细胞，细胞核裂解液裂解白细胞释放出基因组 DNA，然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白，最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大，因此产量的个体差异也可能非常大。

不同样本量的全血提取 DNA 的大致产量与纯度如下：

样本类型	样本量	DNA 平均产量	纯度 (OD260/OD280)
人类全血 (4℃可保存一周)	300 µL	3-10 µg	1.7-1.9
	1 mL	4-30 µg	1.7-1.9
	3 mL	75-150 µg	1.7-1.9
	5 mL	100-200 µg	1.7-1.9
	10 mL	200-400 µg	1.7-1.9

注：根据血液样品中白细胞数量和保存条件的差异，DNA 产量也会有所差异。

04/自备材料

抗凝剂、异丙醇、70%乙醇、去离子水、RNase A

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 环境温度低时细胞核裂解液中某些去污剂成份会析出沉淀，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。蛋白沉淀液可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 水浴几分钟帮助重新溶解，如果不能完全溶解，也不影响使用效果，直接取用上层溶液即可。
- ◇ 本试剂盒可运用于多种抗凝剂的全血，如 EDTA、柠檬酸、肝素抗凝血。其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4℃ 存放少于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。

06/使用方案

1. 吸取 30 mL 1× 红细胞裂解液到一个 50 mL 离心管。

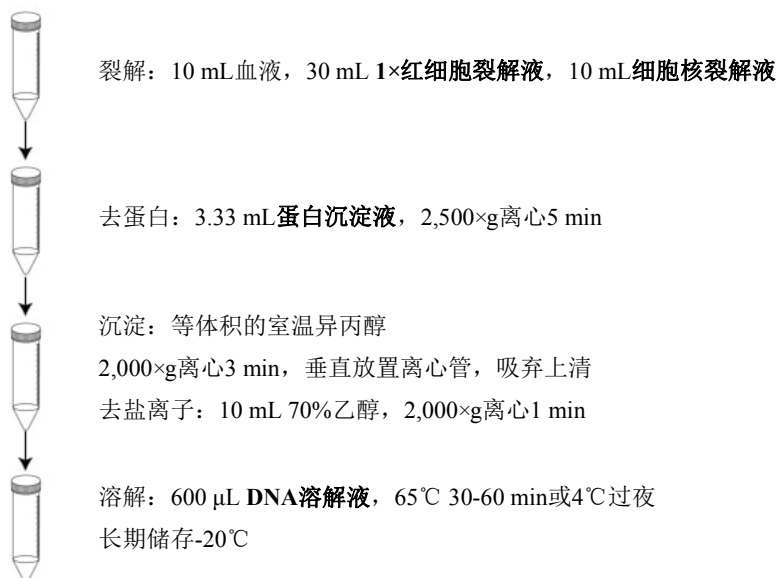
▲ 使用前应该用去离子水将 10× 红细胞裂解液稀释到 1×。

2. 将抗凝全血（使用前恢复到室温）颠倒混匀后，吸取 10 mL 加到上步装有红细胞裂解液离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。

3. 室温放置 10 min（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。

4. 2,500×g离心2 min, 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), 将完整的管底白细胞团和大约100 μL的残留上清留下。
▲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, 应该再加入适量红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤3, 4。
5. 涡旋振荡直到白细胞团充分重悬、分散。
▲白细胞的重悬分散对下一步裂解非常重要, 白细胞未打散就加入细胞核裂解液, 会导致白细胞不能充分裂解, 形成肉眼可见团块。
6. 加入10 mL细胞核裂解液到重悬的白细胞, 上下吹打裂解白细胞, 或者剧烈涡旋10 s帮助裂解白细胞。
▲可选步骤: 在裂解物中加入RNase A (10 mg/mL) 至终浓度30 μg/mL, 颠倒25次混匀, 37℃温育15 min去除残留RNA, 然后冷却回室温。
7. 加入3.33 mL蛋白沉淀液后, 在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀25 s。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。
8. 2,500×g(可根据需要调整加大离心力)离心5 min。这时候应该可以见到管底暗褐色的蛋白沉淀, 也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。
9. 小心吸取上清(约10 mL)到一个新的50 mL离心管中。
▲吸取上清时, 注意不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀。如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中, 可再次离心2 min后取上清。
10. 加入等体积的室温异丙醇(约10 mL), 轻柔颠倒30次混匀或者直到出现棉絮状(丝状)白色DNA沉淀。
11. 2,000×g离心3 min, 在管底可以见到白色的DNA沉淀块, 倒弃上清。
12. 加入10 mL 70%乙醇, 颠倒几次漂洗DNA沉淀, 2,000×g离心1 min, 倒去上清(注意不要把DNA沉淀倒掉), 倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇, 还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇, 空气晾干沉淀几分钟。
▲注意不要干燥过头, 否则DNA极其难溶; 也不能残留太多乙醇, 否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。
13. 加入600 μL DNA溶解液(如果需要浓度高, 可根据需要减少DNA溶解液用量)重新水化溶解DNA沉淀, 轻弹管壁混匀, 可以放置在65℃温育30-60 min(不要超过1 h), 也可以在室温或者4℃放置过夜来重新水化DNA, 中间不时的轻弹管壁帮助重新水化DNA。
14. DNA可以存放在2-8℃, 如果要长时间存放, 可以放置在-20℃。

07/流程简图



08/相关产品

- AA1906 蛋白酶K (10 mg/mL)
- EA0001 红细胞裂解液 (即用型)
- AA0901 SPARKeasy 全血/组织/细胞基因组DNA快速提取试剂盒
- AA1102 SPARKeasy 全血基因组DNA快速提取试剂盒 (小量、含蛋白酶K)
- AC0901 SPARKeasy 全血总RNA快速提取试剂盒

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

