

## 哺乳动物血液基因组 DNA 提取试剂盒

### 一、产品简介

Buffer MG-A 快速裂解细胞, 同时促使 >5 kb 的 DNA 形成容易被离心沉淀的凝集物, 方便处理大体积血液样品。

Proteinase K 配合 Buffer MGLA 释放凝集物中的 DNA; Buffer MGP 去除不溶物; 异丙醇沉淀回收 DNA; 不使用苯酚、氯仿等有害有机溶剂。

适合从 0.1 -20 ml 哺乳动物抗凝全血中提取基因组 DNA; 每毫升新鲜的抗凝全血中可提取多至 60 µg 基因组 DNA, DNA 长度可达 150 kb (DNA 得率和完整性因血液保存方法和时间而异)。获得的基因组 DNA 适用于酶切、Southern 杂交、PCR、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

从新鲜血液、4 度存放一周内的血液或冻存期间未反复冻融的血液中获得 DNA, 其纯度和完整性可满足三代测序的要求。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK602-01 (可从 50ml 血液中提取基因组 DNA)	DK602-02 (可从 200ml 血液中提取基因组 DNA)
Proteinase K*	0.25 ml	1 ml
Buffer MG-A	125 ml	500 ml
Buffer MGS	60 ml	250 ml
Buffer MGV	15 ml	15 ml
Buffer MGLA	30 ml	120 ml
Buffer MGP	6 ml	25 ml
TE*	30 ml	120 ml
3 ml 吸管	100 个	250 个
说明书	1 份	1 份

\*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

\*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% Na<sub>3</sub>, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

### 三、注意事项

1. Buffer MG-A、Buffer MGLA 和 Buffer MGP 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 血液样品短期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, 2-8°C 可保存 10 天, 基因组 DNA 完整性和产量随放置时间延长而下降; 如需获得全长基因组 DNA 尽可能使用新鲜的抗凝血, 或者 2-8°C 保存不超过 3 天。
3. 血液样品长期保存: 加入抗凝剂后充分混合均匀, -70°C 保存。使用时应减少反复冻融, 可在冻存前按所需使用体积分装。
4. 冻存血液应在室温或者 37°C 缓慢解冻, 不可高温加热, 以免血凝块形成; 将冻存血置于 37°C 摇床中 150-200rpm 融化血液效果最佳, 可减少血凝块的形成。也可以提前一天将血液放在 4°C 解冻, 第二天摇晃均匀后恢复至室温。
5. 所有离心步骤结束后, 应立即取出离心管进行下一步操作, 以免在重力作用下沉淀块从离心管底部脱落。

### 四、实验准备

1. 65°C 水浴。
2. 冰水浴。
3. 80% 异丙醇, 70% 乙醇。
4. 根据血液体积准备 2 个合适体积的干净的尖底或者底部带棱角的离心管(参考 page2 表 1)。

## 五、操作步骤

### (一)简要操作步骤和实验原理

设血液体积为 1 V，参考表 1 选择需使用的离心管、计算需使用的试剂体积。	实验原理
1. 加入 1 V Buffer MG-A，剧烈摇晃 20 次，离心去除上清。	裂解细胞，沉淀 DNA
2. 可选：1/2 离心管体积的 Buffer MG-A 充分悬浮沉淀，离心去除上清。	
3. 1/2 离心管体积的 Buffer MGS 充分悬浮沉淀，离心去除上清。	洗涤去除 DNA 凝集物中的蛋白
4. 将离心管倒扣在吸水纸上 2 min；或简短离心，仔细吸除残留的上清。	
5. 1/20V MG V 悬浮沉淀，放置 5 min。	降解蛋白，释放 DNA
6. 1/2 V Buffer MGLA 和 1/200V Proteinase K，65℃水浴 30 min，间断摇晃混合。	
7. 1/10 V Buffer MGP，缓慢翻转混合，离心。	去除可能未溶解的 DNA 凝集物和管口的血污
8. 转移离心上清至干净的离心管，加入 1/2 V 80%异丙醇。缓慢摇晃 20 次，再剧烈摇晃 20 次。 离心沉淀 DNA，去除上清。	异丙醇沉淀 DNA <b>(剧烈摇晃 20 次非常重要)</b>
9. 1/2 离心管体积的 70%乙醇剧烈摇晃 20 次，离心去上清。	洗涤去盐
10. 简短离心吸除残留的上清，室温或者 37℃放置干燥 DNA。	挥发乙醇
11. 至少加入 1/10 V TE 溶解 DNA，而且 TE 体积不可小于 200 μl。	溶解 DNA

表 1. 从各种体积的血液中提取基因组 DNA，需使用试剂的体积和离心管的规格

血液体积/μl	1 V	100-500	600	1000	1500	2000
Buffer MG V/μl	1/20 V	25	30	50	75	100
Buffer MGLA/μl	1/2 V	250	300	500	750	1000
Proteinase K/μl	1/200V	2.5	3	5	7.5	10
Buffer MGP/μl	1/10	50	60	100	150	200
80%异丙醇/μl	1/2 V	250	300	500	750	1000
70%乙醇/μl	1/2 离心管体积	750	750	750	750	1000
TE/μl	≥200	≥200	≥200	≥200	≥200	≥200
离心管体积		1.5 ml		1.5 ml 或 2 ml 管		2 ml

血液体积/ml	1 V	3	4	5	10	15	20
Buffer MG V/ml	1/20 V	0.15	0.2	0.25	0.5	0.75	0.5
Buffer MGLA/ml	1/2 V	1.5	2	2.5	5	7.5	10
Proteinase K	1/200V	15 μl	20 μl	25 μl	50 μl	75 μl	100 μl
Buffer MGP/ml	1/10	0.3	0.4	0.5	1	1.5	2
80%异丙醇/ml	1/2 V	1.5	2	2.5	5	7.5	10
70%乙醇/ml	1/2 离心管体积	5	5	5	5	5	25
TE/ml	≥1/10 V	≥0.3	≥0.4	≥0.5	≥1	≥1.5	≥2
离心管体积			10-15 ml		15 ml	50 ml	

▲Proteinase K 用量为血液体积 1/200，其余试剂的体积可在±25%范围内调整；但 Buffer MGLA、Buffer MGP 和 80%异丙醇三者需按照 5:1:5 的比例加入。

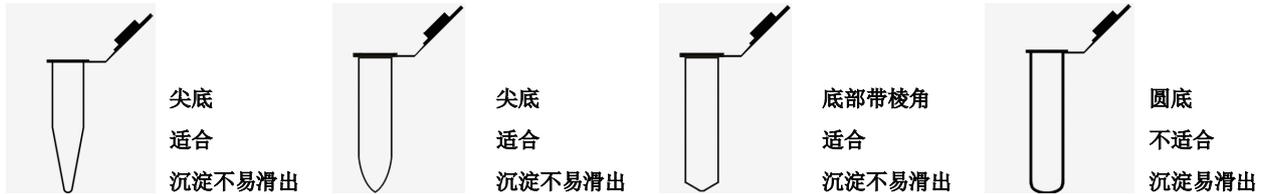
▲处理白细胞数量偏高的血液样品(例如婴幼儿和白血病患者的血液)，Buffer MGLA、Buffer MGP 和异丙醇三者需翻倍使用，按照 1V:1/5V:1V 的量使用，其余试剂的用量不变。

## (二)从 100 $\mu$ l-2 ml 抗凝全血中提取基因组 DNA(★为关键步骤)

所有离心时间按使用台式快速离心机设定, 通常 10 秒内可达最高转速/离心力; 如使用慢升速离心机, 离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温, 12,000-16,000 $\times$ g; 如离心机只能设定转速, 设定为低于最高转速 1,000 rpm。

需使用尖底或者底部带棱角的 1.5-2 ml 离心管, 以免倒弃上清时沉淀物滑出离心管, 见下图:



1. 血液样品和 Buffer MG-A 按照 1:1 的比例加入离心管中, 剧烈摇晃 20 次; 离心 1 min, 缓慢倒弃上清。以同样的方式处理完剩余的血液。

2. 可选步骤: 样品为血凝块或者含有大量血纤维时, 需操作此步骤。

加入 1 ml Buffer MG-A, 剧烈摇晃 20 次, 离心 1 min, 缓慢倒弃上清。

3. 加入 1 ml Buffer MGS, 剧烈摇晃 20 次。离心 1 min, 缓慢倒弃上清。

4. 将离心管倒扣在吸水纸上 2 min; 或简短离心, 仔细吸除残留的上清。

.....以下操作步骤以处理 500  $\mu$ l 血液为例(请参考 page2 表 1 计算需使用试剂的体积) .....

5. 加入 25  $\mu$ l Buffer MGV, 剧烈摇晃 20 次, 室温放置 5 min。

6. 加入 250  $\mu$ l Buffer MGLA 和 2.5  $\mu$ l Proteinase K, 剧烈摇晃 20 次, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min(或更长时间, 可过夜), 间断摇晃混合。

▲为方便操作, 可事先将 Buffer MGLA 和 Proteinase K 按照表 1 混合(100:1); 两者混合后需 1 小时内使用完。

7. 加入 50  $\mu$ l Buffer MGP, 翻转离心管 10 次混合均匀, 在冰水浴中放置 2 min。

▲加入 Buffer MGP 后析出大量不溶物, 在后续离心步骤中可方便去除可能未溶解的 DNA 凝集物和粘在离心管口的血污。

8. 翻转离心管 10 次悬浮沉不溶物, 离心 1 min; 将上清转入一个干净的 1.5 ml 离心管中。

★ 9. 加入 250  $\mu$ l 80%异丙醇; 缓慢翻转离心管 20 次(出现丝状 DNA 凝集物), 再剧烈摇晃 20 次使 DNA 凝集物变得更紧密。离心 1min, 倒弃上清。

▲在出现丝状 DNA 凝集物前, DNA 为溶解状态, 需缓慢翻转离心管。

▲出现丝状 DNA 凝集物后, 需剧烈摇晃去除包裹在 DNA 凝集物中的溶液; 不然最后 DNA 溶解困难, 并且有明显的盐残留。

▲为节约时间, 可在水浴结束前, 在干净的离心管中先加入 80%异丙醇。

★ 10. 加入 750  $\mu$ l 70%乙醇, 剧烈摇晃 20 次; 离心 2 min, 缓慢倒弃上清。

▲此时沉淀物贴壁性差, 倒弃上清时需观察沉淀物位置, 避免丢弃沉淀物。

11. 将离心管倒置在干净的吸水纸上至少 5 min, 或简短离心, 仔细吸除残留的乙醇(勿吸除沉淀)。室温放置 10-20 min 或 37 $^{\circ}$ C 放置 5 min 挥发乙醇。

▲乙醇会影响后续的酶反应, 需要尽可能挥发完全; 但需要避免长时间放置, 完全干燥 DNA 沉淀, 因为完全干燥的 DNA 很难溶解。干燥至 DNA 沉淀为半湿润状态, 无酒精味, 效果最佳。

12. 加入至少 200  $\mu$ l TE, 低速 Vortex 震荡 5 秒或者剧烈摇晃 10 次, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10-60 min 溶解 DNA, 水浴 5 min 后轻弹离心管底部打散 DNA 凝集物(通常继续水浴 10 min 后即可完全溶解); 或 65 $^{\circ}$ C 水浴过夜。

▲至少加入 1/10 血液体积的 TE 溶解 DNA, 而且 TE 体积不可小于 200  $\mu$ l。

(三)从 2-15 ml 抗凝全血中提取基因组 DNA (★为关键步骤)

已去除血浆的血液，应估算起始全血体积，按比例调整起始血液用量。通常 1 ml 去除血浆的血液相当于 2 ml 全血。

需使用尖底的 10-15 ml 离心管，以免倒弃上清时沉淀物滑出离心管，见下图：



1. 血液样品和 Buffer MG-A 按照 1:1 的比例加入 10-15 ml 尖底离心管中(见图示)，剧烈摇晃 20 次；2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。

2. 可选步骤：样品为血凝块或者含有大量血纤维时，需操作此步骤。

用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 10 次)，加入 5-7.5 ml Buffer MG-A，吹捏 3 ml 吸管 10 次，将 3 ml 吸管中溶液吹打入离心管中，丢弃 3 ml 吸管；室温 2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。

3. 用 3 ml 吸管捣碎沉淀物(反复戳 10 次)，加入 5-7.5 ml Buffer MGS，吹捏 3 ml 吸管 10 次，将 3 ml 吸管中溶液吹打入离心管中，丢弃 3 ml 吸管；室温 2,000-4000×g 离心 5 min，缓慢倒弃上清。

.....以下操作步骤以处理 5 ml 血液为例(请参考 page2 表 1 计算需使用试剂的体积) .....

4. 用 3 ml 吸管吸除回流的溶液，戳碎沉淀物(反复戳 10 次)，加入 0.25 ml Buffer MG-V，吹捏 3 ml 吸管 10 次，保留吸管在离心管中，室温放置 5 min。

5. 加入 2.5 ml Buffer MGLA 和 25 μl Proteinase K，吹捏 3 ml 吸管 10 次，保留吸管在离心管中。

▲为方便操作，可事先将 Buffer MGLA 和 Proteinase K 按照表 1 混合(100:1)；两者混合后需 1 小时内使用完。

6. 65℃水浴 30 min(或更长时间，可过夜)，水浴期间保持水浴锅盖子敞开，水浴期间至少混合一次(吹捏 3 ml 吸管 10 次)，最后将吸管中溶液全部打入离心管中，丢弃吸管。

7. 加入 0.5 ml Buffer MGP，盖上离心管盖子，翻转离心管 10 次混合均匀，冰水浴中放置 2min，离心前再缓慢翻转 5 次。

★ 8. 2000-4000×g 离心 2 min，将离心上清转移至干净的 10-15 ml 离心管，加 2.5 ml 80%异丙醇；缓慢翻转离心管 20 次(出现丝状 DNA 凝集物)，再剧烈摇晃 20 次使 DNA 凝集物变得更紧密。

▲在出现丝状 DNA 凝集物前，DNA 为溶解状态，需缓慢翻转离心管。

▲出现丝状 DNA 凝集物后，需剧烈摇晃去除包裹在 DNA 凝集物中的溶液；不然最后 DNA 溶解困难，并且有明显的盐残留。

▲为节约时间，可在水浴结束前，在干净的离心管中先加入 80%异丙醇。

9. 用 3 ml 吸管吸取 DNA 凝集块和部分溶液转入 1.5 ml 离心管中。吸取的体积尽可能接近，以便后续的离心步骤。

10. 12,000×g 离心 1 min，缓慢倒弃上清。

★ 11. 加入 750 μl 70%乙醇，剧烈摇晃 20 次；12,000×g 离心 2 min，缓慢倒弃上清。

▲此时沉淀物贴壁性差，倒弃上清时需观察沉淀物位置，避免丢弃沉淀物。

12. 将离心管倒置在干净的吸水纸上至少 5 min，或简短离心，仔细吸除残留的乙醇(勿吸除沉淀)。室温放置 10-20 min 或 37℃放置 5 min 挥发乙醇。

▲乙醇会影响后续的酶反应，需要尽可能挥发完全；但需要避免长时间放置，完全干燥 DNA 沉淀，因为完全干燥的 DNA 很难溶解。干燥至 DNA 沉淀为半湿润状态，无酒精味，效果最佳。

13. 加入至少 500 μl TE，低速 Vortex 震荡 5 秒或者剧烈摇晃 10 次，65℃水浴 10-60 min 溶解 DNA，水浴 5 in 后轻弹离心管底部打散 DNA 凝集物(通常继续水浴 10 min 后即可完全溶解)；或 65℃水浴过夜。

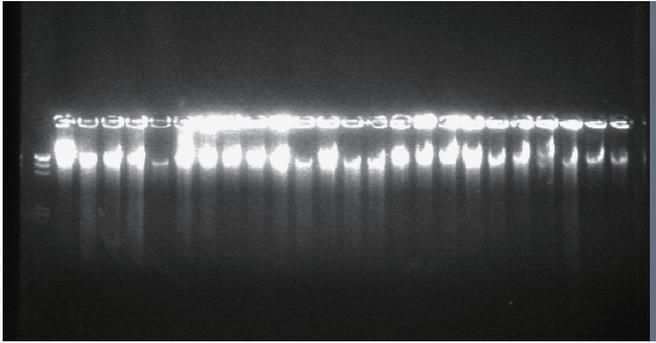
▲至少加入 1/10 血液体积的 TE 溶解 DNA，而且 TE 体积不可小于 200 μl。

操作流程示意图：从2-15 ml抗凝全血中提取基因组DNA

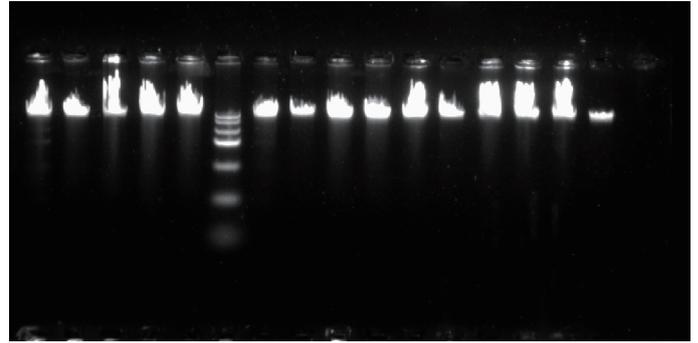


## 六、实验示例

使用 DK602 与同类产品平行处理 2-5ml 血液。



↑ 使用某公司同类产品。  
加样孔较亮：大量蛋白残留；  
DNA 条带弥散、下缘不平整：部分 DNA 完整性差，盐残留明显。



↑ 使用 DK602。  
加样孔相对干净：蛋白残留少；  
DNA 火焰状拖尾、下缘平整：完整性高、无明显盐残留。

## 七、常见问题解答

### Q1. 最后步骤 DNA 很难溶解

A1 加入异丙醇后未剧烈摇晃，DNA 凝集物包裹大量溶液，这种情况下 DNA 沉淀为透明或半透明状。

解决方法：加入 5 倍体积的 Buffer MGLA 和 5  $\mu$ l Proteinase K，65°C 水浴 30 min；继续 page3 操作步骤 7。

### Q2. 步骤 1-2 用 Buffer MG-A 处理倒弃上清时，沉淀物容易从离心管滑出。

A2.1 未使用尖底或者底部带棱角的离心管；

A2.2 血液样品中含有大量血凝块，因为重力作用沉淀块很容易从离心管底部脱落；

A2.3 离心结束后放置时间过长，因为重力作用沉淀块从离心管底部脱落。

解决方法：用移液器吸除上清；或者缓慢倒弃大部分上清后，用移液器吸除残留的上清。

### Q3. 血凝块或含有大量血纤维的血液样品，能否用本试剂盒提取基因组 DNA？

A3. 不推荐使用本试剂盒。Buffer MG-A 不能充分去除血纤维，后者在异丙醇沉淀步骤与 DNA 发生共沉淀。

从  $\leq 0.2$  ml 全血(包括血凝块)中提取基因组 DNA，推荐使用 血液基因组 DNA 少量提取试剂盒 Cat#DK601；

从  $\leq 1$  ml 全血(包括血凝块)中提取基因组 DNA，推荐使用 1ml 血液基因组 DNA 提取试剂盒 Cat#DK603；

从 1-2 ml 全血(包括血凝块)中提取基因组 DNA，推荐使用 2ml 血液基因组 DNA 提取试剂盒 Cat#DK604。

### Q4. 用本试剂盒(沉淀法)与其他基于硅胶材料吸附 DNA 的原理(过柱法)提取的基因组 DNA 有什么差别？

A4.1 纯度：从充分抗凝的血液(或含有少量血凝块)中提取 DNA，两种方法在纯度上没有很大的差别；但是如果样品中含有大量血凝块，沉淀法获得的 DNA 纯度不及过柱法。

A4.1 完整性：沉淀法能获得全长染色体 DNA(可达 150 kb)，尤其适合用于酶切和 Southern 杂交；

过柱法使用硅胶材料吸附 DNA，此过程使 DNA 断裂为 20-30 kb 的片段，能满足芯片和 PCR 等实验。