



Blood Genomic DNA Midi Kit (1-5 mL)

血液基因组柱式中量提取试剂盒 (1-5 mL)

目录号：CW0541S (50 preps)

保存条件：Buffer RCL 2-8°C，其他组分室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW0541S 50 preps
Buffer RCL	3×260 mL
Buffer GR	25 mL
Buffer GL	25 mL
Buffer GW1 (concentrate)	13 mL
Buffer GW2 (concentrate)	15 mL
Buffer GE	15 mL
Proteinase K	50 mg
Proteinase K Storage Buffer	5 mL
Spin Columns DL with Collection Tubes	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的血液样品）、血浆、血清、血沉棕黄层、骨髓、无细胞体液等样本中提取总DNA，包括基因组DNA，线粒体DNA及病毒DNA。本品可以处理1-5 mL的全血，可纯化获得大小为100 bp到50 kb的DNA，纯化的DNA产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质，可直接用于PCR、荧光定量PCR、酶切和Southern Blot等实验。

自备试剂：无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入5 mL Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。
3. 本试剂盒最多可以提取1-5 mL全血样品，如需提取大量血液样本请选用血液基因组非柱式提取试剂盒（#CW0544）。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查Buffer GL是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请置于56℃水浴重新溶解。
6. 如下游实验对RNA污染较敏感，可加入4 μL DNase Free的RNase A（100 mg/mL），RNase A本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0601S。
7. 试剂盒中的Buffer RCL浑浊后不能继续使用。

操作步骤

1. 向离心管（自备）中加入1-5 mL血液样品，加入3倍体积的Buffer RCL轻轻涡旋或颠倒混匀。
2. 3000 rpm（~900 x g）离心10分钟，小心吸弃上清。
3. 向沉淀中加入400 μL Buffer GR，重悬沉淀。

注意：如果下游试验对RNA敏感，可加入4 μL RNase A（100 mg/mL）溶液，震荡15秒，室温放置5分钟。

4. 1-2 mL血液样本提取时，向以上溶液中加入40 μL Proteinase K，混匀；2-5 mL血液样本提取时，向以上溶液中加入100 μL Proteinase K，混匀。
5. 加入400 μL Buffer GL，颠倒混匀15次，剧烈涡旋震荡至少1分钟。

注意：不要直接将Proteinase K直接加入到Buffer GL中。

6. 70℃孵育10分钟, 其间颠倒混匀数次。

注意: 1) 如溶液未彻底清亮, 补加适量Proteinase K, 孵育。延长孵育时间至溶液完全清亮为止。

2) 孵育10分钟DNA的产量已经达到最大, 继续延长孵育时间对DNA产量和纯度没有影响。

7. 加入400 μL无水乙醇, 颠倒混匀10次。短暂离心, 使管壁和管盖上液体集中到管底。

8. 将上步所得到的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DL) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm (~13,400×g) 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如果提取样品是小鼠或猴子等血红素难以除去的种属的血液基因组, 建议重复步骤9。

10. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤10。

11. 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中, 向吸附柱中间部位悬空加入50-200 μL Buffer GE或灭菌水, 室温下放置2-5分钟, 12,000 rpm离心1分钟, 收集DNA溶液, -20℃保存DNA。

注意: 1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5 (可以用NaOH将水的pH值调到此范围), pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

3) 用另外的50-200 μL Buffer GE或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高DNA的终浓度, 可以将步骤12所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上, 12,000 rpm离心1 min; 若洗脱体积小于200 μL, 可以增加DNA的终浓度, 但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μg, 推荐用50 μL Buffer GE或灭菌水洗脱。

5) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响, 如需长期保存, 推荐用Buffer GE洗脱并于-20℃保存。