

目 录

简 介----- 2

原 理----- 2

保质期----- 2

试剂盒组成----- 3

准备工作----- 3

方案 1:血液 DNA 提取----- 4

方案 2:血液黄层 DNA 提取----- 6

常见问题----- 8

版本: 2024-01

简介

SolPure Blood DNA Kit II 是专门为血液样品基因组 DNA 提取而设计的。该方法基于溶液型的纯化方式，可灵活地从各种体积的血液中提取高分子量的基因组 DNA。完成数个样品的抽提工作只需 30 分钟。无需接触酚氯仿抽提，整个抽提过程都在一个离心管内完成。可避免操作过程中样品交叉污染，可减少离心管使用或标记工作。得到的 DNA 可直接用于 PCR、酶切，Southern 杂交等实验。

原理

SolPure Blood DNA Kit II 采用新型的溶液纯化方式，只为血液 DNA 提取专门设计的。血液样品在细胞裂解液(Buffer LB1)中裂解去除细胞，离心收集细胞核；细胞核在裂解液(Buffer LB2)中裂解，加入蛋白酶去除残余的蛋白质；再加入异丙醇沉淀回收 DNA，加入 70%乙醇洗涤去除盐分，最后加入 Buffer TE 溶解 DNA。

保质期

SolPure Blood DNA Kit II 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月，长期保存需放置于 2-8℃。Proteinase K 干粉室温运输，收到试剂盒后，把 Proteinase K 保存于-20℃或 2-8℃。低温保存或运输过程中，Buffer LB2 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

组 成

SolPure Blood DNA Kit II

产品编号	D3321-01	D3321-02	D3321-03
可处理的血液体积	50 ml	200 ml	1000 ml
Buffer LB1	150 ml	2 x 300 ml	3 x 1000 ml
Buffer LB2	30 ml	220 ml	1100 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer TE	5 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 70%乙醇
- 异丙醇
- 灭菌的 1.5ml 离心管，或 15ml 离心管，或 50ml 离心管
- <15,000xg 小型离心机，或适合 15ml 或 50ml 离心管的低速离心机;
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。溶解后，Proteinase K 须分装保存于-20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- 把水浴锅设定 65℃
- 吸水纸

方案 1. 血液 DNA 提取

该方案用于处理▼300µl, ⊕3ml 或⊕10ml 的全血和骨髓样品中提取高分子量 DNA。该方案可方便调整来处理不同体积的样品，只需按比例调节各种溶液的用量。

血液用量	100µl	300µl	500µl	1ml	3ml	5ml	10ml
Buffer LB1	250µl	750µl	1.25ml	2.5ml	7.5ml	12.5ml	25ml
Buffer LB2	50µl	150µl	250µl	0.5ml	1.5ml	2.5ml	5ml
Proteinase K	0.5µl	1.5µl	2.5µl	5µl	15µl	25µl	50µl
异丙醇	50µl	150µl	250µl	0.5ml	1.5ml	2.5ml	5ml
70%乙醇	100µl	300µl	500µl	1ml	3ml	5ml	10ml
Buffer TE	50µl	100µl	200µl	0.3ml	0.5ml	0.5ml	1ml

1. 吸取▼750µl、⊕7.5ml、或⊕25ml Buffer LB1 至▼1.5ml, ⊕ 15ml 或⊕ 50ml 离心管中。
Buffer LB1 体积为血液体积的 2.5 倍。
2. 加入▼300µl, ⊕3ml, 或⊕10ml 抗凝血液至装有 Buffer LB1 的离心管中。颠倒离心管 5 次混匀。
3. ▼14,000 × g 离心 20 秒, ⊕2,000 × g 离心 5 分钟, 或⊕2,000 × g 离心 5 分钟。
1.5ml 或 2ml 离心管, 可用小型离心机离心, 速度设为 14,000 × g; 15ml 或 50ml 离心管, 需采用大型离心机离心, 速度设为 2,000 × g。
4. 小心倒弃上清液, 把离心管反扣于吸水纸上 1 分钟吸弃多余的液体。
细胞核沉淀可能很松, 须缓慢倒弃上清液, 不要倒弃细胞核沉淀。把离心管反扣于吸水纸吸尽溶液, 并尽量避免管口或管壁上的液滴回流。
5. 加入▼150µl, ⊕1.5ml, 或⊕5ml Buffer LB2/Proteinase K 混合液至细胞核沉淀中。立即高速度涡旋 15-30 秒或直至沉淀完全被打散。
Buffer LB2 和 Proteinase K 可预先混匀。混合液放置时间不能超过 30 分钟。加入 Buffer LB2/Proteinase K 后, 要立即涡旋, 一般 30 秒的涡旋就足够打散细胞核沉淀。但是, 有时沉淀团可能会较难打散, 需延长涡旋时间。涡旋后查看沉淀团是否充分打散。这一步必须把细胞核沉淀

团充分打散。

6. 65℃水浴 15 分钟，其间涡旋混匀 2-3 次。
7. 加入↓150 μ l，⊕1.5ml，或⊕5ml 异丙醇至裂解液中。颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
8. ↓ 10,000 $\times$ g 离心 3 分钟，⊕ 2,000 $\times$ g 离心 5 分钟，或 ⊕2,000 $\times$ g 离心 5 分钟。
9. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
10. 加入↓300 μ l，⊕3ml，或⊕10ml 70%乙醇至 DNA 沉淀团中。涡旋混匀。
11. ↓10,000 $\times$ g 离心 3 分钟，⊕ 2,000 $\times$ g 离心 5 分钟，或 ⊕2,000 $\times$ g 离心 5 分钟。
12. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。空气干燥↓5 分钟，⊕ 5 分钟，或⊕15 分钟。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
13. 加入↓ 200 μ l，⊕ 500 μ l，或⊕1ml Buffer TE 至 DNA 沉淀中。涡旋 5 秒。
注：加入 Buffer TE 的体积取决于所需的浓度，可酌情加入。
14. 65℃温育↓30 分钟，⊕1 小时，或⊕ 1 小时溶解 DNA。
15. 室温或 2-8℃ 放置过夜充分溶解 DNA。

由于基因组 DNA 分子量很大，DNA 比较难溶解。我们推荐 65℃温育 1 小时后，在室温放置过夜以充分溶解 DNA。

方案 2. 血液黄层 DNA 提取

该方案用于处理 100-500 μ l 血液黄层样品中提取高分子量 DNA。以下操作以 300 μ l 血液黄层为例，其余样品按下表进行调整。

血液用量	100 μ l	200 μ l	300 μ l	400 μ l	500 μ l
Buffer LB1	250 μ l	500 μ l	500 μ l	1000 μ l	1250 μ l
Buffer LB2	200 μ l	400 μ l	600 μ l	800 μ l	1000 μ l
Proteinase K	2 μ l	4 μ l	6 μ l	8 μ l	10 μ l
异丙醇	200 μ l	400 μ l	600 μ l	800 μ l	1000 μ l
70%乙醇	200 μ l	400 μ l	600 μ l	800 μ l	1000 μ l

血液黄层的制备

1. 取抗凝血液至合适的离心管中。室温下(15-25 $^{\circ}$ C)，1100 $\times$ g 离心 10 分钟后，形成明显的三层结构：澄清的上层液为血浆，中间层就是血液黄层(Buffy Coat)，含浓缩的淋巴细胞，而最下层则为富集的红细胞。血液黄层含有浓缩的淋巴细胞，相同体积的血液黄层的 DNA 产量是血液的 5-10 倍。转移 0.1-0.2 倍的黄层样品至新的离心管中。(举例:3ml 抗凝血液可获得 300-600 μ l 的血液黄层)。冻藏的血液黄层(Buffy Coat)样品须于 37 $^{\circ}$ C 振荡水浴快速解冻。解冻后放置于冰上等待使用。
2. 加入 300 μ l 血液黄层至装有 1.5ml 离心管中。
3. 吸取 750 μ l Buffer LB1 装有样品的离心管中。颠倒离心管 5 次混匀。
注：Buffer LB1 体积为血液黄层体积的 2.5 倍。
4. 14,000 $\times$ g 离心 20 秒。倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上 1-22 分钟吸弃残液。
注：细胞核沉淀可能很松，须缓慢倒弃上清液，不要倒弃细胞核沉淀。把离心管反扣于吸水纸吸尽溶液，并尽量避免管口或管壁上的液滴回流。
5. 加入 600 μ l Buffer LB2/Proteinase K 混合液至细胞核沉淀中。立即高速度涡旋直至沉淀完全被打散。
注：Buffer LB2 和 Proteinase K 可预先混匀。混合液放置时间不能超过 30 分钟。蛋白酶用量为血

液体积的 1/50；Buffer LB2 的体积与血液黄层的体积的 2 倍。加入 Buffer LB2/Proteinase K 后，要立即涡旋，一般 30 秒的涡旋就足够打散细胞核沉淀。但是，有时沉淀团可能会较难打散，需延长涡旋时间。涡旋后查看沉淀团是否充分打散。

6. 65℃水浴 15-30 分钟，其间涡旋混匀 2-3 次。
7. **加入 600μl 异丙醇至裂解液中。**颠倒离心管 30-50 次或直至可看到丝状或团状的 DNA 沉淀。
8. 14,000 × g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
9. **加入 600μl 70%乙醇至 DNA 沉淀。**涡旋洗涤 DNA 沉淀。
10. 14,000 × g 离心 3 分钟。
11. 小心倒弃上清液，并把离心管反扣于干净的吸水纸吸干残留的溶液。空气干燥 10 分钟。倒弃上清液时要注意 DNA 沉淀。不要倒掉沉淀。
12. **加入 200μl Buffer TE 至 DNA 沉淀团中。**涡旋 5 秒。
注：加入 Buffer TE 的体积取决于所需的浓度，可酌情加入。
13. 65℃温育 1 小时溶解 DNA。室温或 2-8℃ 放置过夜充分溶解 DNA。
由于基因组 DNA 分子量很大，DNA 比较难溶解。我们推荐 65℃温育 1 小时后，在室温放置过夜以充分溶解 DNA。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现 象	原因及解决方法
产量低或纯度低	
细胞核不纯	控制离心时间，过长的离心时间会引起细胞碎片的污染；用等倍血液的 Buffer BL1 洗涤细胞核沉淀一次。
细胞核没有充分打散	加入 Buffer BL2/PK 后，必须充分涡旋打散细胞核。
延长蛋白酶消化时间或 加倍 Buffer BL2/PK 的用 量	若细胞核沉淀很难打散，加倍 Buffer BL2/PK 的用量或延长消化时间。
加入异丙醇后混匀不充 分	加入异丙醇后，须颠倒混匀 30-50 次，或直至看到丝状的沉淀。
DNA 沉淀丢失	在倒弃上清液时，DNA 沉淀团被倒掉
DNA 溶解不够	加入更多的 Buffer TE 或 Buffer TE，涡旋重悬 DNA 沉淀团。65oC 水浴 1 小时，室温放置过夜让 DNA 充分溶解。
Proteinase K 失活	重新制备 Proteinase K