

FastPure Blood DNA Mini Kit

FastPure 血液基因组提取试剂盒说明书（离心柱型）

产品组成

FastPure Blood DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1201-50T	EK-1201-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer BL	20mL	40mL
Buffer IRB	17mL	34mL
Buffer BW	12mL	24mL
Buffer ATE	10mL	20mL
Proteinase K Solution	1mL	2mL
RNase A Solution	0.6mL	1.2mL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒适用于哺乳动物血液核酸提取，不含苯酚等有毒化学试剂组分，采用独特的缓冲液配方 Buffer IRB 最大限度去除血液抑制剂的影响，同时应用先进的硅胶膜吸附技术，操作简单、快速。得到的 DNA 比传统试剂盒纯度更高，可直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等分子生物学实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K 溶液和 RNase 溶液外，其余试剂可在室温(15-25°C)保存 12 个月。低温下 Buffer BL 或 Buffer IRB 可能会有沉淀形成，使用时需 55°C 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 溶液和 RNase A

溶液冰袋运输，收到产品后请分装保存于-20°C。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5/2mL 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer BL 和 Buffer IRB 是如有混浊现象，可在 55°C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 基因组提取所有步骤都在室温（15-25°C）下进行。
- 样本要求：本试剂盒首选 EDTA 抗凝血（通常为紫色盖真空管）。亦可使用柠檬酸钠（ACD/枸橼酸钠）抗凝血。严禁或不建议使用肝素抗凝血（通常为绿色盖真空管），因为残留的肝素会严重抑制下游 PCR 扩增及酶促反应。

开始前试剂准备

- 按瓶子标签所示，Buffer IRB 及 Buffer BW 中加入指定体积的无水乙醇稀释，于室温密封保存。

DNA 浓度及纯度检测

- 回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度与浓度。
- DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50µg/mL 双链 DNA、40µg/mL 单链 DNA。
- OD260/OD280 比值应为 1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用 ddH₂O，比值会略低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

应用领域

适合于从约 10µL-1mL 抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取总 DNA。获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞、线粒体 DNA、游离的 DNA(>100bp)、以及病毒 DNA(如乙肝)等；

操作步骤:

1. 转移 250 μ L 抗凝的血液，血清，血浆或其它体液样品至蛋白酶的离心管中。轻轻振荡混匀。若血液小于 250 μ L，用 PBS 或 Buffer ATE 调整总体积至 250 μ L。

注意：首选 EDTA 抗凝血。亦可使用柠檬酸钠抗凝。不建议使用肝素抗凝，残留的肝素会严重抑制下游 PCR 反应。

2. 加入 15 μ L Proteinase K 溶液，最高速度涡旋混匀 5 秒。

注意：Proteinase K 溶液不能与 Buffer BL 先混合。

3. 加入 250 μ L Buffer BL 至样品中。立即颠倒 3-5 次混匀，最高速度涡旋混匀 15-20 秒。后 56 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟，其间涡旋混匀 2-3 次。

注意：涡旋时须让裂解液与血液充分混匀才能保证裂解效果。水浴结束后，简短离心以收集管盖及管壁的水滴。

4. (可选步骤) 若需去除 RNA，加入 10 μ L RNase A Solution 至裂解液中，室温静置 10 分钟。

5. 加入 250 μ L 无水乙醇至裂解样品中，盖上盖子，快速颠倒 3-5 次，涡旋混匀 30 秒。

6. 把 DNA 结合柱装在 2mL 收集管中。转移混合液至柱子中，并以 10,000 \times g 离心 1 分钟。

7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ L Buffer IRB (请先检查是否已加入无水乙醇) 至柱子上并以 10,000 \times g 离心 1 分钟。

8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ L Buffer BW (请先检查是否已加入无水乙醇) 至柱子中，10,000 \times g 离心 1 分钟。

9. 重复操作步骤 8 一次。

10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。12,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的乙醇残留。将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管，室温开盖晾干 5-10 min。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验，务必执行晾干步骤，并确保吸附柱中无肉眼可见的残留液体。

11. 向膜中央悬空滴加 30-100 μ L Buffer ATE，室温静置 2 分钟后以 12,000 \times g 离心 2 分钟收集离心下的基因组 DNA。

Buffer ATE 在 55-60 $^{\circ}$ C 预热后加入膜中央洗脱可提高核酸获得率。静置时间有利于大分子基因组 DNA 释放

12. 弃去柱子，将基因组 DNA 溶液于 -20 $^{\circ}$ C 保存（短期可保存 2-8 $^{\circ}$ C）或进行下游实验。

【附加方案】处理 0.25-1mL 的血液 DNA 抽提 (注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)

- ① 转移 0.25-1mL 抗凝血液样品至 2-15mL 离心管中。
- ② 加入 2.5 倍体积 Buffer RBC 至样品中，颠倒混匀 5-10 次并静置 3 分钟。
- ③ 2,000 \times g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液，并反扣于吸水纸上吸尽残液。（注：倒弃上清液时，小心不要倒弃细胞核沉淀。）
- ④ 加入 250 μ L 灭菌水和 25 μ L 蛋白酶 K 溶液到样品中。涡旋 30 秒打散沉淀团。
- ⑤ 按前述第 3 步加入 Buffer BL 开始进行操作。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品裂解不充分**: 样品与 Buffer BL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer BL 后先颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer BL 充分混匀。
- **Proteinase K 活性下降**: 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于 -20 $^{\circ}$ C。Proteinase K 与 Buffer BL 不能预先混合。
- **样品含凝血块**: 处理陈旧的血液样品时，加大蛋白酶的用量，或用附加方案进行提取。
- **样品含固体颗粒**: 在第 5 步加入乙醇前，10,000 \times g 离心 3 分钟去除未消化的杂质，转移上清液至新的离心管后再加入乙醇。
- **样品用量太多**: 白膜层、浓缩血液、细胞悬液中含大量的细胞，减少样品量。

2. DNA 纯度不达标

- **血液样品中存在凝血块**: 加大蛋白酶 K 的用量，消化过程中用移液枪吸打几次打散凝块。或通过离心去除。处理凝血较多的样品时，需用匀浆器充分匀浆凝块。
- **样品裂解不充分**: 样品与 Buffer BL 混匀不充分。重新提取加入 Buffer BL 后延长混匀及涡旋时间

3. DNA 产量低

- 血浆或血清等无细胞体液样品，其 DNA 含量低，通常只有 ng 级。
- 第 5 步加入乙醇后混匀不充分或乙醇加入的体积不够。
- 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央，可增加洗脱体积或次数。