

血液基因组 DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

血液基因组 DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从人或动物血液或血块中分离纯化基因组 DNA。

【检验原理】

裂解吸附液和蛋白酶 K 使血液基因组 DNA 与蛋白质分离，在裂解吸附液高盐低 pH 的环境下，吸附柱内的硅胶膜高效吸附分离的 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附的 DNA，从而达到快速分离纯化基因组 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-BD01	裂解吸附液 D	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	蛋白酶 K	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 B	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

蛋白酶 K：常温（10-30℃）运输，-20℃保存；

其他成分：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

【注意事项】>使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
2. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
3. 洗脱液的使用量太少会影响提取效果。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
5. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
6. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

EDTA 抗凝的全血或血凝块。血液样本抽取后应尽快提取基因组 DNA；如 2 小时后提取，样本需要保存于 2-8℃，保存时间不超过 72 小时。长期使用的样本需-80℃或液氮保存，或者使用保存液按要求保存。溶血和脂血对提取无影响。

【适用范围】

≤200μL 哺乳动物全血；>200μL 哺乳动物全血需使用溶血剂；5μL 禽类、两栖类动物全血；≤1000μL 哺乳动物血凝块。

【样本用量及得率】

样本类型	样本用量 (μL)	DNA 得率 (μg)
哺乳动物抗凝全血	≤200	1-30
	>200	与样本用量有关
禽类、两栖类抗凝全血	5-10	3-80
血凝块	≤1000	1-40

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000 \times g$ ）、振荡仪、金属浴、1.5mL 离心管、生理盐水、无水乙醇和异丙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。

【样本处理】

一、哺乳动物抗凝全血

1. 全血用量不超过 200μL：

在 1.5mL 离心管中加入 200μL 全血（白细胞层）。如血量不足，用生理盐水补充至 200μL，吹打混匀。

2. 全血用量大于 200μL：

2.1 在全血（白细胞层）样本中加入 2 倍体积的溶血剂（根据需要免费提供），颠倒混匀后静置 2 分钟至溶液清亮， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。

2.2 弃上清，保留细胞沉淀。

2.3 细胞沉淀用 200μL 生理盐水重新悬浮后，转移至 1.5mL 离心管中。

二、禽类、两栖类动物和鱼类抗凝全血

1. 在 1.5mL 离心管中加入 5μL 全血，用生理盐水补充至 200μL，吹打混匀。

2. 瞬时离心，消除泡沫。

三、血凝块

1. 取血凝块加入液化柱（自备）中， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟，收集滤液。

➤如血凝块较大可分批多次过柱，合并滤液。

2. 滤液用量不超过 200μL：

在 1.5mL 离心管中加入 200μL 滤液。如滤液不足，用生理盐水补充至 200μL，充分混匀。

3. 滤液用量大于 200μL：

3.1 在滤液样本中加入 1mL 溶血剂（根据需要免费提供），颠倒混匀后静置 2 分钟， $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。

3.2 弃上清，保留细胞沉淀。

➤沉淀物较多（裂解不彻底）时，可以在沉淀中再次加入 1mL 溶血剂后重复步骤 3.1-3.2

3.3 细胞沉淀用适量生理盐水重新悬浮后，取 200 微升转移至 1.5mL 离心管中。

【快速操作流程】



1. 准备工作
 - ☑ 检查RAW1是否配制。
 - ☑ 检查80%乙醇水溶液是否配制。
2. 在含200μL样本的1.5mL离心管中加入200μL裂解吸附液D和20μL蛋白酶K，充分混匀，瞬时离心，60℃静置孵育10分钟。
3. 加入200μL无水乙醇，吹打混匀。转移所有液体至吸附柱。
4. 闭盖12,000×g离心1分钟。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。
5. 加入600μL RAW1，闭盖12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。
6. 加入600μL 80%乙醇水溶液，闭盖12,000×g离心20秒。弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。
7. 加入600μL无水乙醇，闭盖12,000×g离心20秒。取出吸附柱，丢弃收集管。
8. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，闭盖12,000×g离心3分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。
9. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入100μL洗脱液B至吸附柱中心位置。闭盖室温静置3分钟，12,000×g离心1分钟，收集洗脱液。

【标准操作步骤】

1. 在上述含 200μL 样本的 1.5mL 离心管中加入 200μL 裂解吸附液 D 和 20μL 蛋白酶 K，充分混匀。瞬时离心，60℃静置孵育 10 分钟。

➤提取禽类和两栖类血液样本 DNA 时，60℃ 1,500rpm 振荡孵育 10 分钟可以获得更好的提取效果。

2. 开盖，加入 200μL 无水乙醇，吹打混匀。将吸附柱放入收集管中，转移所有液体至吸附柱。

➤加入 200μL 无水乙醇后，禽类和两栖类血液样本易出现絮状沉淀，该沉淀的出现不影响 DNA 提取。

➤150μL 异丙醇代替 200μL 无水乙醇也可以获得较好的提取效率。

3. 闭盖 12,000×g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600μL RAW1。闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

➤加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液。闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 无水乙醇。闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

7. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，闭盖 12,000×g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

8. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 100μL 洗脱液 B 至吸附柱膜上中心位置。闭盖室温静置 3 分钟，12,000×g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

➤洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整，但不得低于 30μL。

➤两次洗脱可以提高 20%左右的提取效率。

【血液基因组 DNA 提取（柱式法）常见问题】

常见问题	原因	解决方案
未提取到 DNA 或产量低	1. 样本使用量过多	减少有核红细胞样本的使用量，禽类、两栖类动物抗凝全血加入量一般为 5-10 μ L，最大不超过 20 μ L。
	2. 样本使用量过少	增加血液样本使用量，参考【适用范围】。
	3. 样本未及时保存或保存不当	样本保存温度不当或保存时间过长，内源性 DNase 导致 DNA 降解。采用新鲜或正确保存的样本。
	4. 样本裂解不充分	蛋白酶 K 失活。使用新鲜蛋白酶 K。
	5. 乙醇使用量过少或过多	按说明书准确加入无水乙醇。
	6. RAW1 中乙醇添加比例不当	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	7. 80%乙醇水溶液配制不当	使用无水乙醇配制 80%乙醇水溶液，使乙醇含量达 80%。
	8. 洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65 $^{\circ}$ C 预热洗脱液、延长室温静置时间或者进行二次洗脱。
DNA 降解	1. 样本未及时保存或保存不当	采用新鲜或正确保存的样本。
	2. 样本反复冻融	避免样本反复冻融，分装保存。
	3. 使用 EDTA 以外的抗凝剂抗凝	其他抗凝剂可能加速 DNA 的降解。使用 EDTA 抗凝剂抗凝的样本，对新样品重新纯化。
纯度低	1. 盐离子残留	避免 RAW1 接触吸附柱上下口；使用 80%乙醇水溶液再洗涤 1 次。
	2. 乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000 $\times$ g 再离心 3 分钟。
RNA 残留	1. 样本使用量过高	减少血液样本使用量，参考【适用范围】。

【说明书编制日期】 2025 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司
公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室
网 址：www.wuxi-medtech.com
联系电话：173 1562 0564 138 6175 7779