

Code No. 9781S

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Whole Blood
Genomic DNA Extraction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 实验前的准备	1
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 注意事项	5
● Q&A	5

● 制品说明

本试剂盒用于从 1 μl~1 ml 加入各种抗凝剂的无核红细胞（如哺乳动物）全血中提取基因组 DNA，或从加入各种抗凝剂总体积不超过 10 μl 的有核红细胞（如鸟类、鱼类）全血中提取基因组 DNA。试剂盒采用了特别的红细胞裂解方法裂解全血中的大量无核红细胞，再由细胞裂解液裂解白细胞并释放基因组 DNA，再结合 DNA 制备膜技术纯化基因组 DNA。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，整个提取操作过程仅需 1 个小时便可获得高纯度的基因组 DNA。提取得到的基因组 DNA 可用于 PCR 反应、Southern 杂交以及 RAPD、AFLP、RFLP 等多种分子生物学实验。

● 制品内容（10 次量）

本试剂盒分 Part I 和 Part II 两部分

■ Part I 部分（-20℃保存）

Proteinase K (20 mg/ml)	200 μl
RNase A (10 mg/ml)	100 μl

■ Part II 部分（室温 15~25℃保存）

10×Buffer RCL A ^{*1}	800 μl
10×Buffer RCL B ^{*2}	3.2 ml
Buffer GB ^{*3}	2.5 ml
Buffer WA ^{*3}	6 ml
Buffer WB ^{*4}	4.5 ml
Elution Buffer	2 ml
Spin Columns	10 支
Collection tubes	10 支

*1 和*2 使用前按照 1:4 的比例混合，得到 10×Buffer RCL（红细胞裂解液）。该 10×Buffer RCL 可以现用现配或在首次使用时将*1 全部倒在*2 的试剂瓶中，于 4℃可保存 1 年。

*3 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

*4 在首次使用前，请添加 10.5 ml 的 100%乙醇，混合均匀。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆无水乙醇
- ◆灭菌水
- ◆PBS Buffer

● 保存与运输

1. 本试剂盒分两部分保存和运输，Part I 请在-20℃保存和运输；Part II 在室温下（15-25℃）保存和运输。
2. 10×Buffer RCL A，10×Buffer RCL B 可于室温下保存，按比例混合后的 10×Buffer RCL 可于 4℃保存 1 年，客户可根据实际使用情况决定保存方式。

● 实验前的准备

1. 准备 56℃水浴。
2. 将 10×Buffer RCL A 和 10×Buffer RCL B 按照 1:4 的比例混合，得到 10×Buffer RCL。在使用前用灭菌水将 10×Buffer RCL 稀释 10 倍后使用，按照要处理全血 2 倍体积量准备 1×Buffer RCL，并且要现配现用，请勿将稀释液长时间保存，以免影响裂解效果。
3. Buffer WB 在首次使用前，请添加 10.5 ml 的 100%乙醇，混合均匀。

- 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时，将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65°C 使用将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

● 操作方法

操作流程见图 1，全套操作约需 60 分钟，分为红细胞裂解、DNA 释放、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，详细说明如下：

提取无核红细胞血液材料时：

- ◆ 200 μ l ~ 1 ml 新鲜全血起始：按照操作步骤 1~15 进行；
- ◆ 200 μ l ~ 1 ml 冻存全血起始：2,000 rpm 离心 5 分钟，弃多余上清（使用移液器小心吸取），保留 200 μ l 上清及沉淀物，处理好的样品直接按操作步骤 7~15 继续操作；
- ◆ 全血体积不足 200 μ l 时，用 PBS 将全血总体积补至 200 μ l 后直接按操作步骤 7~15 继续操作。

提取有核红细胞血液材料时：

- ◆ 全血起始使用量请勿超过 10 μ l，用 PBS 将全血总体积补至 200 μ l 后直接按操作步骤 7~15 继续操作。

- 1 \times Buffer RCL 的制备：按照 1:4 的比例，取适量 10 \times Buffer RCL A 和 10 \times Buffer RCL B 混合后，再加入总体积 9 倍体积的灭菌水，制成 1 \times Buffer RCL 待用（按照要处理全血 2 倍体积量准备 1 \times Buffer RCL）。
- 向全血样品中加入全血样品量 1.5 倍体积的 1 \times Buffer RCL，混匀后室温（15~25°C）静置 15 分钟。
- 2,000 rpm（切勿使用更大的离心力）离心 5 分钟，弃上清（将上清小心倒出）。
- 向沉淀中加入全血样品量 0.5 倍体积的 1 \times Buffer RCL，混匀后将溶液转移至 1.5 ml tube 中，室温静置 10 分钟。
- 2,000 rpm（切勿使用更大的离心力）离心 2 分钟，弃上清（使用移液器小心吸取）。观察沉淀中是否残留有明显的红色未被裂解的红细胞，如果有则重复操作步骤 4，直至红细胞无明显残留。（大部分哺乳动物全血经过 2 次裂解即可将红细胞裂解充分，但像马血等红细胞膜较厚的材料则需要多次裂解。）
- 加入 200 μ l PBS 重悬细胞。
- 向处理好的样品中，加入 200 μ l Buffer GB 及 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml)，10 μ l RNase A (10 mg/ml) 混匀后，56°C 温育 10 分钟。
- 加入 200 μ l 100% 乙醇，充分吸打混匀。
- 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，溶液移至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 2 分钟，弃滤液。
- 将 500 μ l 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 将 700 μ l 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。

注）请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。请沿 Spin Column 管壁四周加入 Buffer WB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

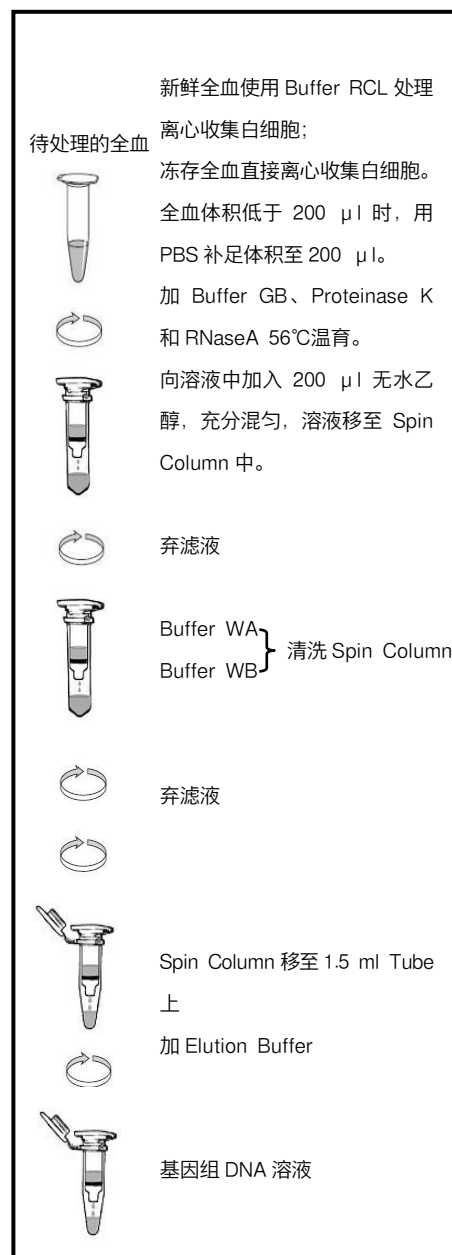


图 1. 操作流程简图

12. 重复操作步骤 11。
13. 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 分钟。
14. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 30~200 μ l 的 Elution Buffer 或灭菌水, 室温静置 5 分钟。
注) 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。
15. 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。如需获得更大收量, 可将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央或再加入 30~200 μ l 的 Elution Buffer 或灭菌水, 室温静置 5 分钟后, 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。
16. 基因组 DNA 定量。提取得到的基因组 DNA 可通过电泳或测定吸光度定量。

● 实验例

1. 从新鲜的马全血中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 1 ml 新鲜的马全血 (含 Na₂EDTA 抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 5 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 2。

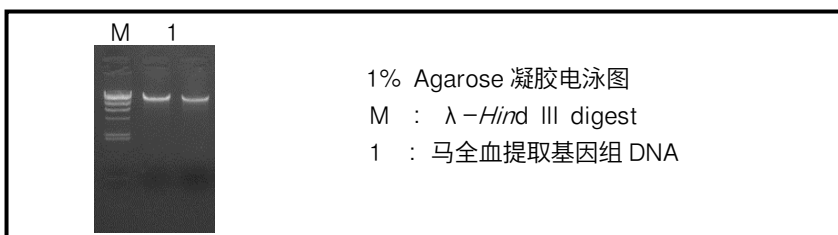


图 2. 从新鲜的马全血中提取基因组 DNA

2. 从新鲜的猪全血中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 1 ml 新鲜的猪全血 (含 Na₂EDTA 抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 10 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 3。

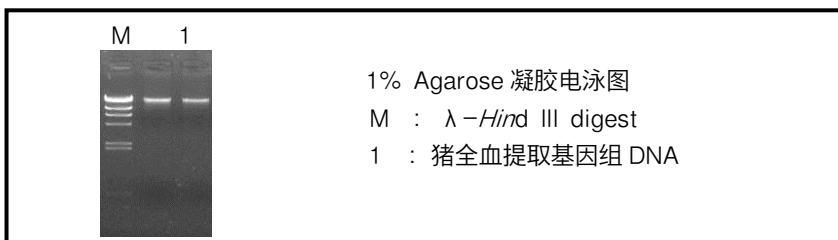


图 3. 从新鲜的猪全血中提取基因组 DNA

3. 从-80 $^{\circ}$ C冻存的全血中提取 DNA 的实验例

使用本试剂盒分别从 1 ml 冻融次数不同的猪全血 (含 Na₂EDTA 抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了不同收量的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 4。

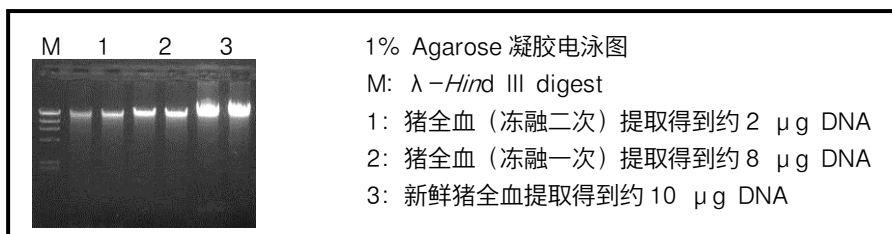


图 4. 从冻存的含 Na₂EDTA 抗凝剂猪全血中提取基因组 DNA

4. 从新鲜的鱼全血中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒从 5 μ l 的鱼全血 (含 Na₂EDTA 抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 12 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 5。

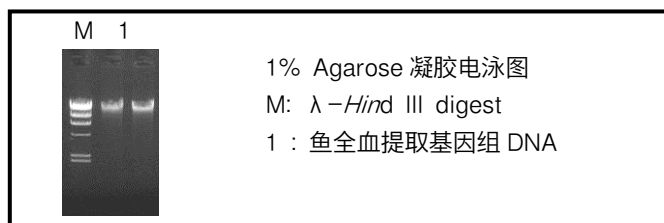


图 5. 从新鲜的含 Na₂EDTA 抗凝剂鱼全血中提取基因组 DNA

5. 从新鲜的人全血中提取基因组 DNA 的实验例

使用本试剂盒分别从 1 ml 的人全血 (分别含柠檬酸钠抗凝剂、Na₂EDTA 抗凝剂、肝素钠抗凝剂) 中提取基因组 DNA, 最终分别纯化得到了约 5 μ g 的高纯度基因组 DNA。其电泳结果见图 6。

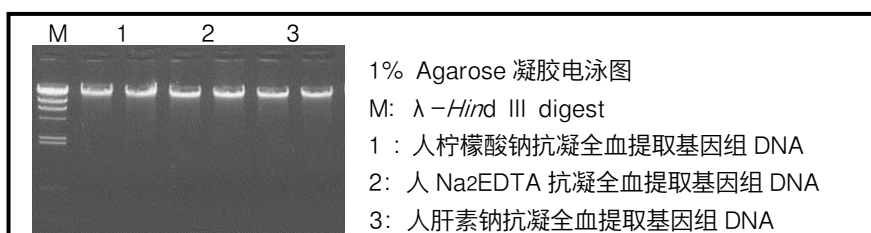


图 6. 从新鲜的含不同抗凝剂人全血中提取基因组 DNA

6. 从人全血中提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增的实验例

使用本试剂盒从 1 ml 人全血提取基因组 DNA, 最终纯化得到了约 5 μ g 的高纯度基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板, PCR 扩增了 β -Globin 基因的约 17.5 kb 的 DNA 片段, 其电泳结果见图 7。

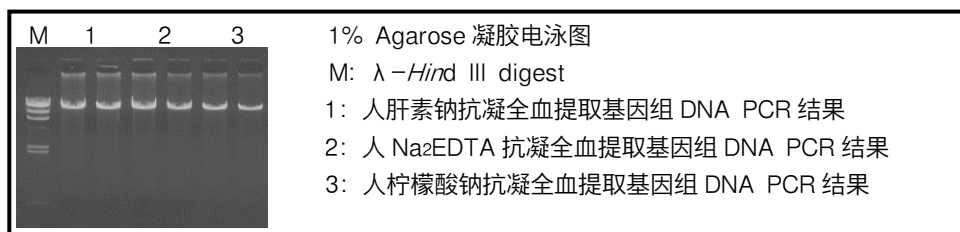


图 7. 从人全血中提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增结果

7. 从 1 μ l 和 5 μ l 新鲜小鼠全血中提取 DNA, 并扩增 B2m 基因的 3 kb 片段的实验例, 见图 8。

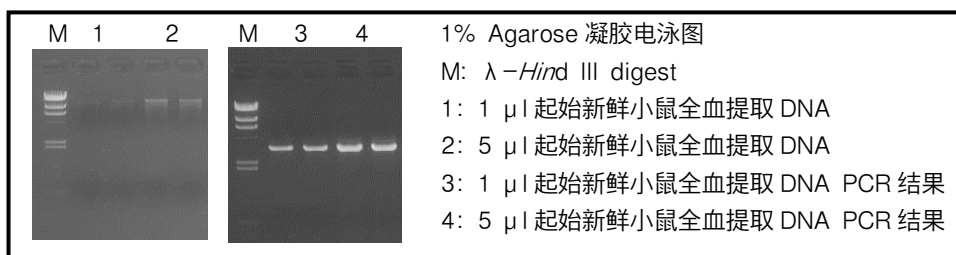


图 8. 从微量新鲜小鼠全血中提取 DNA, 并扩增 3 kb 片段的结果

● 注意事项

1. 应尽量使用新鲜全血，避免反复冻融，以确保提取的基因组 DNA 的收量及完整性。
2. 血液样品的保存：
 - ① 短期保存：已加入抗凝剂的血液样品可在 2~8℃ 保存最多 10 天，对于某些实验，例如 Southern 杂交等，需要得到完整全长的基因组 DNA，将血液样品在 2~8℃ 保存请不要超过 3 天。
 - ② 长期保存：已加入抗凝剂的血液请置于 -70℃ 保存，血液样品应尽量避免反复冻融。
3. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时应寻求医疗咨询。
4. 基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 洗脱。
5. 标准实验操作适用于人全血材料，其他哺乳动物全血操作基本相同。只是在裂解红细胞时不尽相同，例如马血等材料需要多次处理，才可使红细胞裂解充分（红细胞膜较厚）；而一些小型的动物可能需要减少裂解时间和次数。
6. 离心时切不可使用过大的离心力，否则白细胞将会破损，而无法正常悬浮。
7. 10×Buffer RCL 是由 10×Buffer RCL A 和 10×Buffer RCL B 按照 1:4 比例混合配制得到，可以现配现用，也可以在首次使用时将 10×Buffer RCL A 和 10×Buffer RCL B 全部混在一起，然后保存在 4℃，可以保存一年以上。
8. 在使用前一定要确认待提取全血的红细胞是否有核，如果为红细胞有核的全血，若起始量超过 10 μl 则可能造成 Spin Column 堵塞。

● Q&A

- Q1. 基因组 DNA 的收量如何？
- A1. 本试剂盒可从新鲜的全血或冻存的全血（全血起始量不超过 1 ml）中提取基因组 DNA。从新鲜的全血材料中提取得到的 DNA 量较多，如从 1 ml 马全血中提取获得 5 μg 基因组 DNA；从 1 ml 猪全血中提取获得 10 μg 基因组 DNA；从 1 ml 人全血中提取获得 5 μg 基因组 DNA；从 5 μl 的鱼全血，纯化得到了约 12 μg 的基因组 DNA。但若使用冻存的、反复冻融的或长时间保存的全血材料，DNA 的收量将明显减少。
- Q2. 基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA，为什么？
- A2. 基因组 DNA 收量较低时，可以从以下几个方面考虑：
- ① 洗脱时将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65℃ 后使用将有利于提高洗脱效率；
 - ② 起始全血量较低或全血不够新鲜（避免反复冻融），DNA 已经降解；
 - ③ 请严格按照操作方法进行操作。
- Q3. 提取的基因组 DNA 有降解，为什么？
- A3. ① 血液样品不够新鲜，已加入抗凝剂的血液样品可在 2~8℃ 保存 10 天；
- ② 加入 Buffer RCL 后，放置太长时间会导致提取的基因组 DNA 降解，应严格按照实验步骤操作。
 - ③ 红细胞裂解不充分，若加入 Buffer RCL 裂解红细胞后，离心收集的沉淀中仍残留明显的红色沉淀，应重复使用 Buffer RCL 进行裂解。
- Q4. 提取的基因组 DNA 中有 RNA 污染，为什么？
- A4. ① 实验过程中没有使用 RNase A。应严格按照实验操作要求使用 RNase A。
- ② RNase A 可能失活。RNase A 尽可能在 -20℃ 下保存。
- Q5. 提取的基因组 DNA 反应性能差，为什么？
- A5. ① 提取的基因组 DNA 中盐份浓度过高。在使用 Buffer WA 和 Buffer WB 进行 DNA 制备膜的清洗时，请沿 Spin Column 的管壁四周加入，且加入 Buffer WB 后室温静置 5 分钟，有助于彻底清洗掉 Spin Column 上残留的盐离子，这样有利于提高清洗效果。
- ② 洗脱液中残留乙醇，在向 Spin Column 中加入洗脱液之前，将 Spin Column 在室温下静置 2 分

钟有助于使 Spin Column 上残留的乙醇彻底挥发，然后再加入洗脱液洗脱。

③ 进行 DNA 洗脱时请一定在膜的中央加入洗脱液，尽量不要沾染 Spin Column 的管壁四周。

Q6. 冻存全血与新鲜全血的 DNA 提取量上有何区别？

A6. 全血经过冻存后会使大部分的红细胞和部分白细胞破裂。由于 DNA 主要存在于白细胞中，所以通常情况下冻存全血的 DNA 提取量会减少 20%~50%。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>