

5. 本试剂盒可运用于多种抗凝剂的全血，如 EDTA，柠檬酸，肝素抗凝血。其中由于肝素抗凝血的白细胞沉淀团很难打散重悬，影响裂解效果，建议选用非肝素的抗凝剂收集血液标本。
6. 为了最佳效果，最好使用新鲜血液标本或者 4℃ 存放小于 3 天的标本，不要使用反复冻融超过 3 次的标本，否则会严重降低产量。
7. 对于每个样品提取血量大的客户或者用量大的客户，可以和我们联系，我们另有专门准备有优惠的大包装试剂。

五、操作步骤

1. 吸取 900 μ l 红细胞裂解液到一个 1.5ml 离心管。
2. 将抗凝全血（使用前回复到室温）颠倒混匀后，吸取 300 μ l 加到上述装有红细胞裂解液离心管中，颠倒 6-8 次，并倒置轻弹管壁，确保充分混匀。
3. 室温放置 10 分钟（期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞）。
4. 12,000 rpm 离心 20 秒，倒弃红色上清，并小心的尽可能多的吸弃上清（注意不要吸到管底的细胞团），留下完整的管底白细胞团和大约 10 μ l 的残留上清。

离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该再加入 900 μ l 红细胞裂解液重悬细胞团后重复步骤 3，4。

5. 涡旋振荡 15 秒重悬白细胞团，充分分散白细胞团。

白细胞的重新分散对下一步裂解非常重要，白细胞未打散就加入裂解液，会导致白细胞不能充分裂解，形成肉眼可见团块。

6. 加入 300 μ l 细胞核裂解液到重悬的白细胞，迅速有力吹打几次混匀

以裂解白细胞，由于基因组 DNA 立刻释放出来，这个时候混合物会马上变得十分粘稠，立刻停止吹打（以免剪切断基因组 DNA），颠倒旋转离心管 10 次保证裂解液和所有的白细胞接触并裂解。

这一步对是否获得满意的裂解效果和基因组完整性很关键。吹打力量如果太小，不足以迅速将细胞团打散并和裂解液混匀，形成肉眼可见团块无法裂解完全（裂解液如果是和细胞团块而不是分散的细胞接触，立刻会和细胞团块表面作用后形成粘稠的屏障，不容易再渗透入团块内部）。裂解液和细胞接触后基因组 DNA 立刻释放出来，这个时候吹打力量过大，又易造成基因组断裂。正确做法，就是迅速有力的吹打几次，几秒钟后基因组释放出来（变粘稠）立刻停止吹打，或者改用大口径枪头（剪去枪头尖）轻柔吹打或者颠倒混匀。如果还有肉眼可见团块，可在 65℃ 温育 30-60 分钟（不要超过一小时）至裂解完全。

7. 可选步骤：在裂解物中加入 RNase A（10mg/ml）至终浓度 100 μ g/ml，颠倒 25 次混匀，37℃ 温育 15 分钟去除残留 RNA。然后冷却回室温。
8. 加入 100 μ l 蛋白沉淀液后，在涡旋振荡器上高速连续振荡混匀 25 秒。混匀后可能见到一些小的蛋白团块。由于样品体积重量小，用涡旋振荡器振荡混匀产生的剪切力并不会剪切打断基因组 DNA，如果用手振荡混匀，则不可以用手上下剧烈振荡混匀，只能适当力度振荡混匀，否则会剪断基因组 DNA，但是力度也不能小，要保证充分混匀，将粘稠的裂解物打散开，否则 DNA 无法和蛋白质沉淀分离开，离心的时候会和蛋白质一起沉淀下来，造成 DNA 丢失或者降低产量。此外混匀不充分也可能造成蛋白沉淀不充分，最后的产物污染有较多量的蛋白质。因此建议新手还是用涡旋振荡器混匀。
9. 13,000rpm 离心 5 分钟。这时候应该可以见到管底暗褐色的蛋白沉淀，也可能见到一些蛋白沉淀漂浮在液体表面。
10. 小心吸取上清（大约 300 μ l）到一个新的 1.5ml 离心管中。吸取上清时小心不要吸到管底的和漂浮在液体表面的蛋白沉淀，如果不小心将蛋白沉淀转入新的离心管中，可再次离心 2 分钟后取上清。

11. 加入等体积的室温异丙醇 (300 μ l), 轻柔颠倒 30 次混匀或者直到出现棉絮状 (丝状) 白色 DNA 沉淀。

注意有时候棉絮状 (丝状) DNA 沉淀颠倒混匀的时候, 粘附着在盖子或者管口处, 即使颠倒也不跟下来, 或者附着有气泡导致漂浮在液面, 这样导致操作者看不到沉淀, 误认为没有得到 DNA。解决办法是略去步骤 12, 直接 12, 000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 然后接步骤 14。

12. 垂直放置离心管, 让白色 DNA 沉淀自然沉到管底, 然后尽可能多的吸弃大部分的上清, 注意不要吸到沉淀。

13. 加入 1ml70%乙醇后, 颠倒混匀, 12,000rpm 离心 1 分钟, 在管底可以见到白色的 DNA 沉淀块, 倒弃上清。

14. 加入 0.5ml70%乙醇, 颠倒几次漂洗 DNA 沉淀, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒去上清 (注意不要把 DNA 沉淀倒掉了), 倒置后在吸水纸上轻敲几下以控干残留乙醇, 还可以用枪头小心吸掉管底沉淀周围和管壁的残留乙醇, 空气晾干沉淀几分钟。

注意不要干燥过头, 否则 DNA 极其难溶, 也不能残留太多乙醇, 否则乙醇可能抑制下游如酶切反应。

15. 加入 100 μ lDNA 溶解液重新水化溶解 DNA 沉淀, 轻弹管壁混匀, 可以放置在 65 $^{\circ}$ C 温育 30-60 分钟 (不要超过一小时), 中间不时的轻弹管壁帮助重新水化 DNA。也可以在室温或者 4 $^{\circ}$ C 放置过夜来重新水化 DNA。

16. DNA 可以存放在 2-8 $^{\circ}$ C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20 $^{\circ}$ C。

二、原理简介

本试剂盒根据全血特点采用几个快速步骤提取基因组 DNA。首先红细胞裂解液裂解去除不含 DNA 的红细胞, 细胞核裂解液裂解白细胞释放出基因组 DNA, 然后蛋白沉淀液选择性沉淀去除蛋白, 最后纯净的基因组 DNA 通过异丙醇沉淀并重溶解于 DNA 溶解液。

三、试剂盒特点

1. 从十几个配方中优选出的红细胞裂解液配方, 裂解快速完全。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂。
3. 快速, 简捷, 单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 结果稳定, 产量高 (典型的产量 300 μ l 全血可提取出 5-15 μ g), OD260/OD280 典型的比值达 1.7~1.9, 长度可达 50Kb-150kb, 可直接用于构建文库, PCR, Southern-blot 和各种酶切反应。

四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13, 000 rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 用户需自备异丙醇和 70%乙醇。
3. 典型的产量 300 μ l 全血可提取出 5-15 μ g 基因组 DNA (不同样品尤其疾病样品中白细胞数量差异可能非常大, 因此产量的个体差异也可能非常大)。
4. 本试剂盒为溶液型, 可以很容易的按照比例扩大或者缩小每次处理的全血量 (20 μ l-10ml), 请联系我们索取其它处理量的操作手册。