



Blood Genomic DNA Midi Kit (1-5 ml)

血液基因组柱式中量提取试剂盒 (1-5 ml)

目录号：CW0541S (50 preps)

保存条件：Buffer RCL 2-8℃，其他组分室温 (15-30℃)

产品内容

Component	CW0541S
	50 preps
Buffer RCL	3×260 ml
Buffer GR	25 ml
Buffer GL	25 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer GE	15 ml
Proteinase K	50 mg
Proteinase K Storage Buffer	5 ml
Spin Columns DL with Collection Tubes	50

产品简介

本试剂盒适用于从新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的血液样品）、血浆、血清、血沉棕黄层、骨髓、无细胞体液等样本中提取总DNA，包括基因组DNA，线粒体DNA及病毒DNA。本品可以处理1-5 ml的全血，可纯化获得大小为100 bp到50 kb的DNA，纯化的DNA产量高、质量好，最大限度去除蛋白、色素、脂类及其他抑制性杂质，可直接用于PCR、荧光定量PCR、酶切和Southern Blot等实验。

自备试剂：无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入5 ml Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。
3. 本试剂盒最多可以提取1-5 ml全血样品，如需提取大量血液样本请选用血液基因组非柱式提取试剂盒（#CW0544）。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查Buffer GL是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请置于56℃水浴重新溶解。
6. 如下游实验对RNA污染较敏感，可加入4 μl DNase Free的RNase A（100 mg/ml），RNase A本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0601S。
7. 试剂盒中的Buffer RCL浑浊后不能继续使用。

操作步骤

1. 向离心管（自备）中加入**1-5 ml**血液样品，加入**3倍体积的Buffer RCL**轻轻涡旋或颠倒混匀。
2. 3000 rpm（ $\sim 900 \times g$ ）离心10分钟，小心吸弃上清。
3. 向沉淀中加入**400 μ l Buffer GR**，重悬沉淀。
注意：如果下游试验对RNA敏感，可加入4 μ l RNase A（100 mg/ml）溶液，震荡15秒，室温放置5分钟。
4. 1-2 ml血液样本提取时，向以上溶液中加入**40 μ l Proteinase K**，混匀；2-5ml血液样本提取时，向以上溶液中加入**100 μ l Proteinase K**，混匀。
5. 加入**400 μ l Buffer GL**，颠倒混匀15次，剧烈涡旋震荡至少1分钟。
注意：不要直接将Proteinase K直接加入到Buffer GL中。
6. 70℃孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。
**注意：1）如溶液未彻底清亮，补加适量Proteinase K，孵育。延长孵育时间至溶液完全清亮为止。
2）孵育10分钟DNA的产量已经达到最大，继续延长孵育时间对DNA产量和纯度没有影响。**
7. 加入**400 μ l无水乙醇**，颠倒混匀10次。短暂离心，使管壁和管盖上液体集中到管底。
8. 将上步所得到的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DL）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm（ $\sim 13,400 \times g$ ）离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入**500 μ l Buffer GW1（使用前检查是否加入无水乙醇）**，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
注意：如果提取样品是小鼠或猴子等血红素难以去除的种属的血液基因组，建议重复步骤9。
10. 向吸附柱中加入**500 μ l Buffer GW2（使用前检查是否加入无水乙醇）**，12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤10。
11. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附柱中间部位悬空加入**50-200 μ l Buffer GE 或灭菌水**，室温下放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用NaOH将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

3) 用另外的50-200 μ l Buffer GE或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤12所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，12,000 rpm离心1min；若洗脱体积小于200 μ l，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1 μ g，推荐用50 μ l Buffer GE或灭菌水洗脱。

5) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用Buffer GE洗脱并于-20 $^{\circ}$ C保存。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途