



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蛋白难以除去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°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°C 保存。