

Code No. 9450

研究用

Takara

Blood Genome DNA
Extraction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存	1
● 注意事项	1
● 实验操作	2
● 处理多量血液的方法	3
● 采血后样品的处理、保存以及 DNA 的收量	3
● 提取 DNA 用于 PCR 反应时的参考条件	4
● Q&A	5

● 制品说明

本制品是从全血中提取适合各种实验用的高纯度 DNA 的试剂盒。标准的操作规程是使用 100 μ l 的血容量，但实际操作时也可以处理更多量的血液。

本试剂盒含有 GenTLE Solution I、II、III 三种溶液。其中 GenTLE Solution I 的作用是在破坏血细胞的同时，与核酸形成电中性的复合体。将该复合体离心收集并用 GenTLE Solution II 清洗后，在沉淀中加入 GenTLE Solution III，将 DNA 分离出来，然后再加入异丙醇将 DNA 沉淀回收。整个操作只需 40 分钟左右，便可提取高纯度的 DNA，操作十分简单方便。由于 GenTLE Solution I 具有破坏菌体和病毒粒子的作用，这对于处理那些担心有可能发生病原菌等污染的样品非常有利。而且 GenTLE Solution I 与核酸生成的复合体牢固、稳定，便于样品的运输以及大量样品的处理。

本试剂盒既适用于尚未凝固的全血，又适用于经各种抗凝剂（柠檬酸、EDTA、肝素）处理过的全血，无论经过哪种抗凝剂处理，每 100 μ l 人的血液都能得到 1 μ g 以上的 DNA，其纯度 A₂₆₀/A₂₈₀ 可达 1.8~2.0。提取的 DNA 可用于 PCR 扩增和限制酶切等实验。

● 制品内容 (100 次量)

GenTLE Solution I	50 ml × 1 瓶
GenTLE Solution II	50 ml × 2 瓶
GenTLE Solution III	50 ml × 1 瓶

【试剂盒之外必备主要试剂及仪器】

- ① 离心机
- ② 异丙醇
- ③ 70%乙醇

● 保存： 室温*

* GenTLE Solution I 和 GenTLE Solution II 在 20°C 以下时有可能产生沉淀。此时，请按照注意事项 1. 和 2. 中所介绍的方法使沉淀完全溶解后使用。

● 注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. GenTLE Solution I 保存于 20°C 以下时，有时会出现沉淀，所以最好于 20°C 以上保存。如出现沉淀，可在 50°C~55°C 加热 1~2 小时，使沉淀完全溶解后使用。但是请注意，60°C 以上加热时，性能可能会有所下降。
2. GenTLE Solution II 出现沉淀时，请离心取上清使用。
3. GenTLE Solution I 有引起烧伤的危险。一旦溅入眼中或触到皮肤上，请立即用大量水冲洗。
4. 气温低时，GenTLE Solution I 的粘度增大，有时较难吸取，此时请于 37°C 加热数分钟后使用。
5. 为防止污染，分装时请使用新的灭过菌的 Tip。
6. DNA 的收量，会因抗凝剂的种类以及血液的保存条件的不同而各异。使用之前请务必阅读“采血后样品的处理、保存和 DNA 收量”部分。
7. 柠檬酸、EDTA、肝素三种抗凝剂均可使用。但肝素对酶反应有可能起阻害作用，采血时如没有特殊要求，请使用柠檬酸或 EDTA 处理血样。
8. 提取后的 DNA，请用 TE 溶解，溶解后的 DNA 冷冻或 4°C 保存都可以。但如果用灭菌水溶解，请务必冷冻保存，以防止 DNA 分解。

● 实验操作: (以处理 100 μ l 全血为例)

操作流程见图 1, 详细内容如下。

特别注意

操作步骤 4 (除去 GenTLE Solution I 和血液混合物) 以及操作步骤 9 (除去 GenTLE Solution III 和异丙醇混合物) 的实验操作特别重要, 请严格按操作方法进行。

1. 按处理样品数准备 1.5 ml 离心管, 并各加入 GenTLE Solution I 500 μ l。
2. 把混合均匀的 100 μ l 血液, 加入到分装好的 GenTLE Solution I 的离心管中, 立即振荡数秒钟*1。

*1 不管处理多少样品, 血液加入到 GenTLE Solution I 中, 要立即进行振荡混合, 否则有可能降低收量。

3. 室温放置 10 分钟以上, 然后在室温*2 条件下 12,000 rpm 以上离心 5 分钟。离心时, 请注意离心管在离心机里的摆放方向要统一, 离心管的小耳朵朝上 (见下图 A)。此时几乎看不到 DNA 沉淀。

*2 若离心温度低, 会对收量和纯度有影响, 请于 20°C 以上离心。

4. 用移液枪小心除去管中溶液, 此时沉淀看不清, 紧贴在离心管外侧 (带小耳朵一侧) 的内壁上, 除去溶液时, 请一定注意枪头不要碰到离心管外侧的内壁, 插到离心管内侧的底部 (见下图 B), 注意不要吸走沉淀物。



图 1. 试剂盒操作流程

5. 加入 1 ml 的 GenTLE Solution II。此时 GenTLE Solution II 应沿着离心管内侧的内壁加入到离心管中 (见下图 C)。



图 A

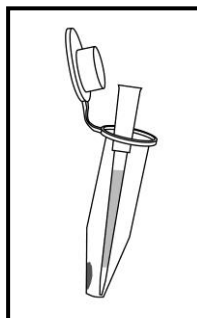


图 B

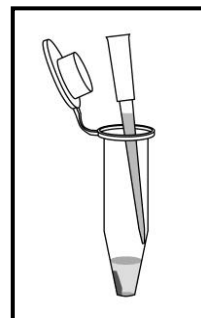


图 C

6. 轻柔地上下颠倒离心管数次^{*3}，室温 12,000 rpm 以上离心 2 分钟，用移液枪小心地除去上清溶液（方法参见实验操作 4.）。

*3 剧烈振荡将影响收量和纯度。

7. 向离心管中加入 GenTLE Solution III 500 μ l，轻微振荡 10 秒钟充分混合。

8. 室温 12,000 rpm 以上离心 5 分钟，把上清溶液移至另一个新的离心管中。

9. 加入等体积（500 μ l）的异丙醇，上下轻柔颠倒数次，均匀混合。

10. 4°C、12,000 rpm 离心 5 分钟，小心除去上清溶液^{*4}。

*4 GenTLE Solution III 中含有影响酶反应的物质，所以一定要除净上清溶液，但应注意不要吸走沉淀。

11. 加入 1 ml 的 70%乙醇清洗沉淀，4°C、12,000 rpm 离心 5 分钟，小心地除去上清溶液（方法参见*4）。

12. 干燥沉淀^{*5}。

*5 因为该方法提取的 DNA 较大，完整性好，所以请一定不要干燥过度。Tube 中看不到有明显的液体或没有乙醇气味后，就可以加入 TE 进行溶解。如果沉淀已经变白，说明干燥过度，此时加入 TE，可能沉淀不能完全溶解，DNA 的收量可能会受到影响。

13. 根据下一步实验需要，用 10~50 μ l 适当的缓冲液（例如 TE 缓冲液等）溶解沉淀。

● 处理多量血液时的方法

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

将标准操作方法按比例扩大规模，可以进行多量的血液处理。此时，必须严格遵守 GenTLE Solution I 和血液的比率（5 : 1），三种 Solution 的比率基本上是 GenTLE Solution I : GenTLE Solution II : GenTLE Solution III = 1 : 2 : 1。

表. 处理下列几种血液量时的各种 Solution 的使用量

血液量	GenTLE Solution			离心管容量
	I	II	III	
200 μ l	1 ml	2 ml	1 ml	2 ml
1 ml	5 ml	10 ml	5 ml	10 ml
1.5 ml	7.5 ml	15 ml	7.5 ml	15 ml
2 ml	10 ml	15 ml	7.5 ml	15 ml

注) 处理 1 ml 以上的多量血液时，由于来自血细胞的 PCR 反应阻碍物的大量带入，有时会影响 PCR 扩增。此时建议最后再做一次苯酚处理，会提高 PCR 反应的效果。

● 采血后样品的处理、保存以及 DNA 的收量

1. 各种抗凝剂处理的血液

如果是在当日提取 DNA，在操作之前，可于 4°C 保存。

如果不在当日提取 DNA，建议分装后于 -80°C 冷冻保存。-80°C 的保存期限为两个月，反复冻融时 DNA 的收率会有所下降。

2. 血液和 GenTLE Solution I 混合液的保存

无论哪种抗凝剂处理的血液，如果采血当日与 GenTLE Solution I 混合放置，至第 10 天时提取 DNA 的收率为当日提取的 90%。混合状态的保存温度，以室温最佳；4°C 保存收率稍有下降；-80°C 保存收率下降 50% 左右。

3. 4℃保存的血液

4℃保存收率稍有下降（收率：90%左右），一般至第4天时提取DNA几乎没有问题，但肝素处理血纯度有下降趋势。至第10天时，肝素处理血提取DNA很难，柠檬酸、EDTA处理血收率虽稍有下降（收率：85%左右），但仍可提取。

4. 室温保存的血液

肝素处理血保存至第4天时提取较难。柠檬酸、EDTA处理血至第4天时虽收率稍有下降（收率80%左右），但仍可提取，但至第10天时很难提取。

下表显示各种抗凝剂处理血于-80℃、4℃及室温保存至第4天、第10天后提取DNA的收率情况。所表示的收率是以采血后立即提取DNA时的收率作为100%进行计算的。

	抗凝剂处理血			与 GenTLE Solution I 的混合物
	肝素	柠檬酸	EDTA	
-80℃	第10天（收率90%） 建议不在当日提取DNA时采取此种保存方法 可保存两个月			第10天（收率50%） 不提倡采取此种保存方法
4℃	第4天（收率90%）*			
	第10天 提取效果差	第10天（收率85%）		第10天（收率85%）
室温	提取效果差	第4天（收率80%）		第10天（收率90%）
		第10天提取效果差		

* 肝素处理血于4℃保存时，提取的DNA纯度有下降趋势（ $A_{260}/A_{280} \leq 1.8$ ）。

● 提取的DNA用于PCR反应时的参考条件

1. PCR反应液组成。

试剂	使用量
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
Human Primer 1	20 pmol
Human Primer 2	20 pmol
提取的模板DNA	2 μl
TaKaRa LA Taq	0.5 μl
灭菌水	up to 50 μl

2. 反应条件（扩增 Human β-globin 基因 17.5 kb 片段）。

94℃	1 min	} 30 Cycles
98℃	10 sec	
68℃	15 min	

说明

- ① PCR 反应条件要根据 PCR 扩增仪、引物以及所扩增的目的片段等情况而决定。
- ② PCR 反应使用的模板 DNA 量要少于从 5 μl 全血中提取的 DNA 量。如果从 100 μl 的全血中提取的 DNA 溶解于 50 μl 的 TE Buffer 中时，用于 PCR 反应（50 μl 体系）的模板量（DNA 溶液）不得超过 2.5 μl 。

● Q&A

Q-1 如何干燥才能保证 DNA 的完整性和收量？

A-1 使用本试剂盒要特别注意干燥步骤。

因为该方法提取的 DNA 较大，完整性好，所以请一定不要干燥过度。Tube 中看不到有明显的液体或没有乙醇气味后，就可以加入 TE 进行溶解。如果沉淀已经变白，说明干燥过度，此时加入 TE，可能沉淀不能完全溶解，DNA 的收量可能会受到影响。

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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v201912Da