



# (DP349) 血液基因组

## DNA提取试剂盒操作指南

### ——中量全血操作流程（1-10 ml血样）

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170331

[WWW.TIANGEN.COM](http://WWW.TIANGEN.COM)

# 实验准备

1. 抗凝或新鲜全血(本实验以10 ml人的新鲜全血 (a) /抗凝血 (b) 分别为例)
2. 移液器及配套无菌枪头 (2.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1ml), 15 ml离心管
3. 无水乙醇, 70%乙醇, 干净的吸水纸
4. 涡旋振荡器, 金属浴/水浴, 台式离心机



## Step 1 (a-1)



10 MI 新鲜血样

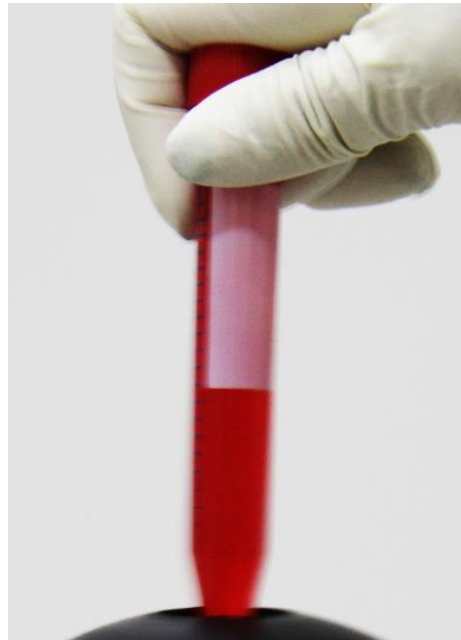


3,600 rpm (~2,000 × g) 离心  
15-20 min, 倒弃上清, 抽  
弃血浆



取中间白膜层细胞加入到15 ml离心管中

## Step 1 (a-2)

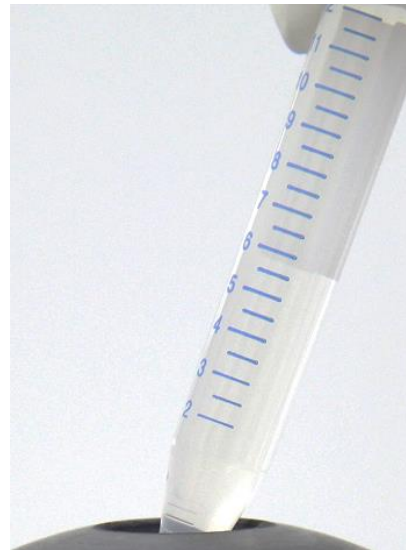


加入10 ml细胞裂解液  
CLA

涡旋混匀10 sec

3,600 rpm (~2,000 × g) 离心2 min, 倒弃上清

## Step 1 (a-3)



再加入15 ml细胞裂解液CLA

涡旋混匀10 sec

3,600 rpm( $\sim 2,000 \times g$ )离心2 min, 倒弃上清

## Step 1 (b-1)



两个15ml离心管中分别加入5 ml全血和5 ml细胞裂解液CLA

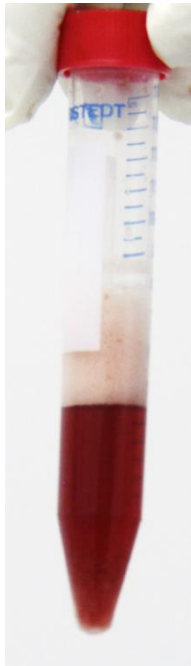


颠倒混匀5次



3,600 rpm (~2,000 × g) 离心3 min, 倒弃上清

## Step 1 (b-2)



再加入2.5 ml细胞裂解液  
CLA，涡旋混匀10sec，混  
合到一支离心管里

3,600 rpm( $\sim 2,000 \times g$ )  
离心3 min

倒弃上清

## Step 2

按照表1配制缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，**此混合液最好现用现配，并在配好后1 h之内用完**

表1 不同体积血液所需各种缓冲液用量 (μl)

	血液体积 (μl)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
细胞裂解液CLA	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
缓冲液FGA	67	200	667	2000	3333	6667	13333
Proteinase K	0.5	1.5	5	15	25	50	100
100%异丙醇	67	200	667	2000	3333	6667	13333
70%乙醇	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
缓冲液TB	100	200	200	300	500	1000	1000
补加缓冲液FGA和Proteinase K混合液	10	30	100	300	500	1000	1000



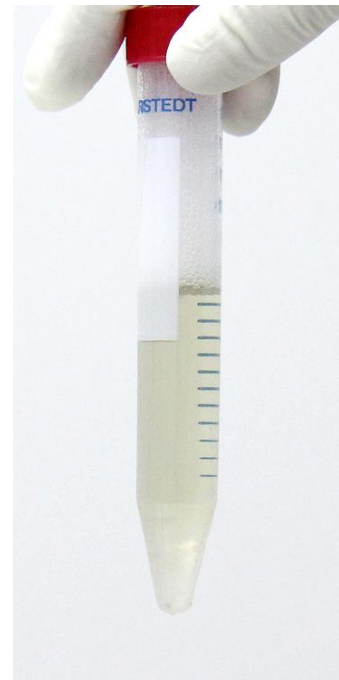
## Step 3



加入6.7 ml缓冲液FGA与Proteinase K的混合液，立即上下剧烈震荡或涡旋混匀至溶液无明显团块。

**注意：**当处理多个样品时，加入缓冲液FGA和Proteinase K的混合液后要立即上下剧烈震荡或涡旋混匀，不要等所有的样品加完后再混匀。有可能出现痕量的胶状沉淀难以混匀，此时可再次补加缓冲液FGA和Proteinase K的混合液（具体补加量见表1），再次涡旋混匀。

## Step 4

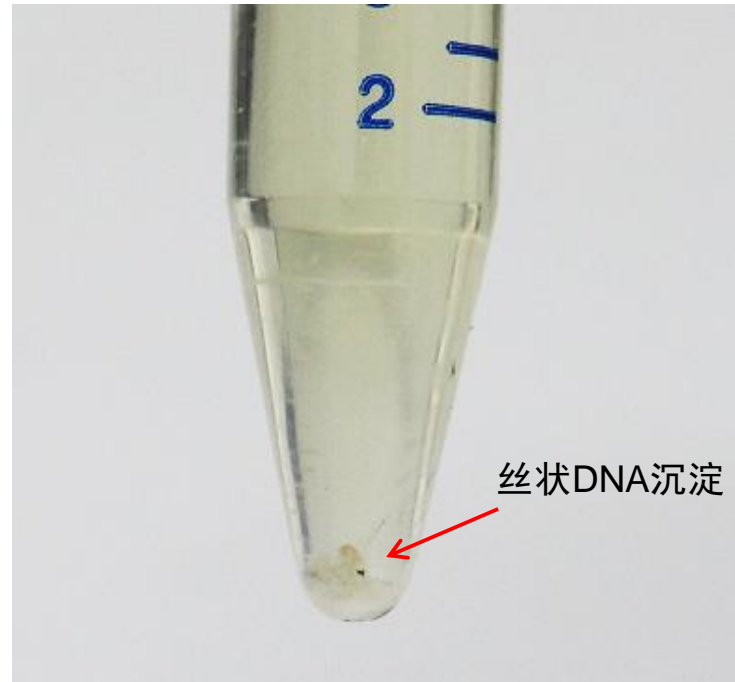


65°C水浴30 min，其间颠倒混匀数次，溶液变清亮

## Step 5



加入6.7 ml异丙醇



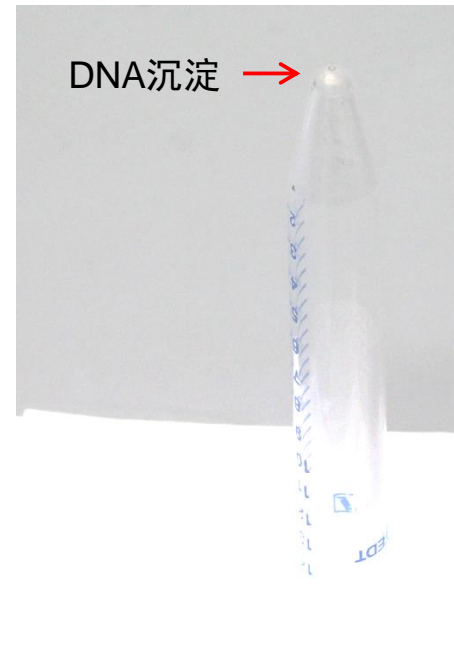
上下颠倒混匀50次至出  
现丝状或簇状基因组DNA

**注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要，一定要充分混匀。**

## Step 6



3,600 rpm (~2,000 × g) 离心 10 min



倒弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上，确保沉淀在管中。

**注意：**在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清。如果样品的白细胞数量足够多，可以看到白色的DNA沉淀。

## Step 7

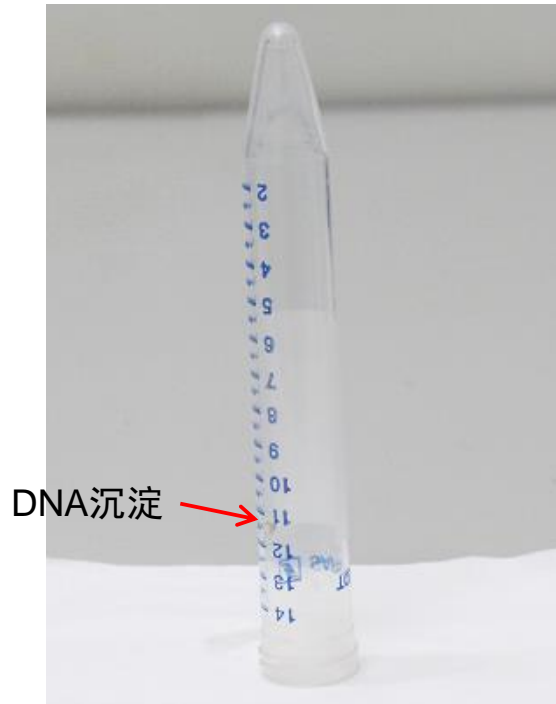


加入10 ml 70%乙醇，涡旋振荡5 sec



3,600 rpm( $\sim 2,000 \times g$ )离心3 min, 倒弃上清

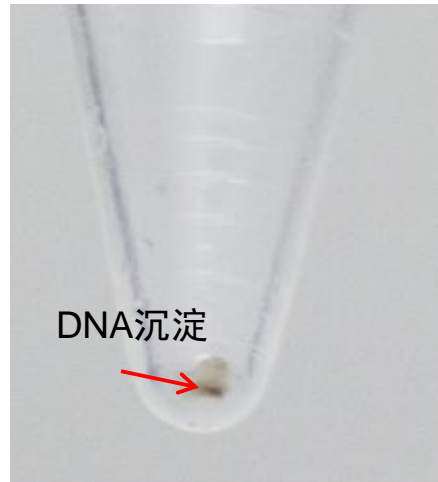
## Step 8



将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少5 min，确保沉淀在管中。

**注意：**在极少的情况下沉淀可能会很松弛，所以要缓慢倒上清，将离心管倒置在吸水纸上是为了减少管壁中上清的回流。

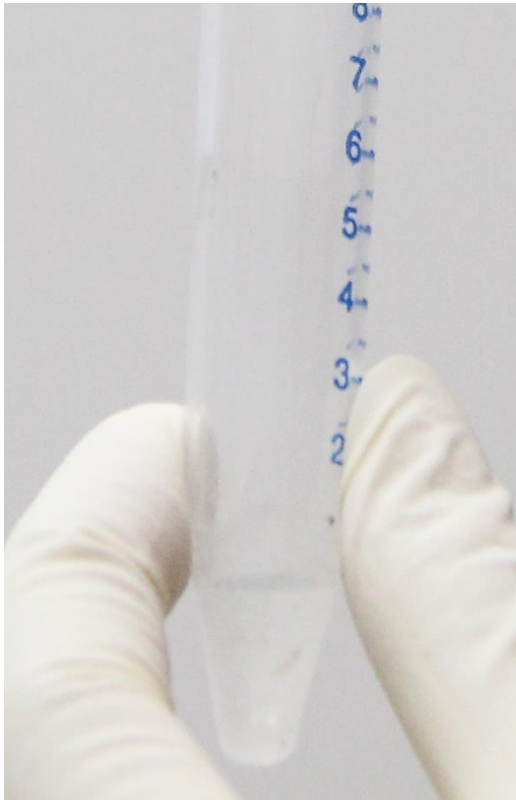
## Step 9



空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5 min）。

**注意：**乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。但是要避免过分干燥DNA沉淀，因为过于干燥的DNA很难溶解。

## Step 10



加入1 ml缓冲液TB，低速涡旋5 sec，  
65°C加热30 min溶解DNA，其间轻弹  
数次助溶。

**注意：**如有难溶性物质存在，可将65°C孵  
育时间延长至1 h。