

# Omega 基因组 DNA 提取系列

## E.Z.N.A.<sup>®</sup> SE Blood DNA Kit

### 简介

E.Z.N.A.<sup>™</sup> SE Blood DNA Kit 适合于从 1  $\mu$ l-1ml 新鲜, 冷冻或抗凝的全血样品中提取高分子量的基因组DNA, 同时也适用于从血液黄层、骨髓和培养细胞中快速简单的提取高分子量的基因组DNA。该试剂盒可以在 30 分钟内完成操作。一般一次实验可相当方便的处理 300  $\mu$ l 的全血样品。该试剂盒不需要酚氯仿抽提, 或者耗时的操作如CsCl梯度离心、异丙醇沉淀或LiCl沉淀。使用该试剂盒提取到的RNA可以用于PCR, Southern杂交, 酶切消化等实验。

E.Z.N.A.<sup>™</sup> SE Blood DNA Kit采用了Omega公司的小量DNA结合柱该方案可以对超过60Kb的基因组DNA进行提取, 首先裂解细胞在调节结合条件的情况下通过DNA结合柱, 然后洗涤去掉残余蛋白和污染物, 在去离子水或者低盐的情况下, DNA快速有效的被洗脱。

### 储存和稳定性

E.Z.N.A.<sup>™</sup> SE Blood DNA Kit除了RNase保存在-20 度外所有成分都可以保存在 22-25 度。在这种情况下存放 24 个月, 提取得到的DNA其纯度仍可以用来做PCR。冷冻保存的情况下, Buffer BL可能会出现沉淀, 可以 55 度水浴溶解。Buffer WTL室温下保存。所有E.Z.N.A.<sup>™</sup> SE Blood DNA Kit在购买后储存于 22-25 度可以保存至少 24 个月。

### 试剂盒成分

Cat.No.	D3471-00	D3471-01	D3471-02
Purification Times	5 preps	50 preps	200 preps
HiBind DNA Mini Columns	5	50	200
2 ml Collection Tubes	5	50	200
Buffer ERL(10 $\times$ )	3 ml	25 ml	70 ml
Buffer WTL	2 ml	20 ml	60 ml
Buffer BL	2 ml	20 ml	60 ml

DNA Wash Buffer Concentrate	2 ml	20 ml	3 x 20 ml
RNase A	12 ul	120 ul	420 ul
Buffer HB	3 ml	30 ml	110 ml
Elution Buffer	2 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

### 实验前的准备

ERL Buffer(10 $\times$ )使用前必须用ddH<sub>2</sub>O进行稀释:

D3471-00	每瓶加 27 ml 水
D3471-01	每瓶加 225 ml 水
D3471-02	每瓶加 630 ml 水

使用前, DNA Wash Buffer 母液必须按使用说明书的表要求用无水乙醇 (96-100%) 进行稀释:

D3471-00	每瓶加 8 ml 无水乙醇 (96-100%)
D3471-01	每瓶加 80 ml 无水乙醇 (96-100%)
D3471-02	每瓶加 80 ml 无水乙醇 (96-100%)

### A 多于 300 $\mu$ l 全血的 SE 血液微量操作

#### 用户自备设备与试剂

##### 准备工作:

- 台式离心机和无核酸酶 2ml 离心管
- 水浴 65 度
- 培养箱 37 度
- 无水乙醇 (96-100%)
- 可选: 蛋白酶 K (20mg/ml)

- 将样品加至 2ml 离心管, 加 3 倍体积 ERL Buffer, 混匀, 室温放置 5min, 放置时适当摇匀。  
注意: ERL Buffer 必须稀释后才能使用

2. 室温 14000xg 离心 30s, 在尽量不打散白色沉淀的情况下去掉上清, 剩余 10  $\mu$ l 左右。如果血液样品是冰冻的, 重复操作步骤 1-2 直至沉淀为白色。

假如白细胞沉淀上仍有一些红细胞或细胞残质, 可加 2 体积的 ERL 混匀, 室温放置 2min, 进行步骤 2 至沉淀为白细胞沉淀。

3. 振荡离心管重悬白细胞沉淀。加入 240  $\mu$ l WTL Buffer, 高速振荡 30S 裂解细胞, 溶液变得粘稠, 如果溶液混匀后仍有明显凝块存在可放入 37 度水浴直至其消失。

注: 加入 WTL 之前先涡旋, 这样有利于白细胞充分裂解。

4. (建议) 加 3  $\mu$ l 蛋白酶 K, 混匀, 放于 55 度水浴 10-30min。

5. 加 2  $\mu$ l RNase A 溶液混匀, 室温放置 10min。

6. 加入 250  $\mu$ l Buffer BL, 振荡混匀, 65 度 10min, 在此期间摇晃混匀 2 次。

7. 加 250  $\mu$ l 无水乙醇, 振荡完全混匀。假如出现看见颗粒点, 上下摇晃 10 次。

8. 把 HiBind DNA 柱套在 2ml 收集管中(已提供), 将第 7 步得到的溶液全部转入柱中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃滤液。

9. 加入 500  $\mu$ l Buffer HB 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液

10. 将 HiBind DNA 结合柱重新套回 2ml 收集管中, 加入 650  $\mu$ l DNA Wash Buffer (含乙醇) 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液;

注意: DNA Wash Buffer 使用前须按要求用无水乙醇稀释。如果放入冰箱中, 使用前须恢复到室温。

11. 将 HiBind DNA 结合柱套在新的 2ml 收集管中, 再加入 650  $\mu$ l DNA Wash Buffer (含乙醇) 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液;

12. 将 HiBind DNA 结合柱重新套回 2ml 收集管中, 最高速 ( $\geq 13,000 \times g$ ) 离心空结合柱 2min 以干燥柱子的基质; 这一步对下面的洗脱步骤至关重要。

13. 将柱子置于 2ml 无核酸酶离心管, 加入 500-100ul 70 $^{\circ}$ C 预热的 DNA Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置于 5min;

14. 室温下, 10,000  $\times g$  离心 1min, 以洗脱 DNA。

15. 把柱子置于另一个 1.5ml 离心管, 重复用另 50-100  $\mu$ l 的预热的 DNA Elution Buffer 离心洗脱, 弃去柱子。将 DNA 储于 -20 度。

注意: 第一次洗脱可得到 60%~70% 结合于柱上的 DNA, 而两次洗脱的总量一般可大于 90%。然而, 增加洗脱体积会减少最终产物的浓度。若想得到高浓度的 DNA, 可使用 50  $\mu$ l ~100  $\mu$ l 的 DNA Elution Buffer 来洗脱。洗脱体积低于 50ul 将大大减少产量。另外可使用第一次洗脱液进行第二次洗脱。

## B. 400 $\mu$ l -1ml 全血的 SE 血液微量操作

### 用户自备设备与试剂

至少 13000xg 离心机

15ml 管 2000xg 离心

37 度水浴锅

1.5ml 无核酸酶离心管

可选: 蛋白酶 K (20mg/ml)

1. 超过 1ml 的样品加至 15ml 离心管, 加 3 倍体积 ERL Buffer, 混匀, 室温放置 5min, 放置时适当摇匀。

注意: ERL Buffer 必须稀释后才能使用

2. 室温 2000xg 离心 5min, 在尽量不打散白色沉淀的情况下去掉上清, 剩余 20  $\mu$ l 左右。如果血液样品是冰冻的, 重复操作步骤 1-2 直至沉淀为白色。

假如白细胞沉淀上仍有一些红细胞或细胞残质, 可加 2 体积的 ERL 混匀, 室温放置 2min, 进行步骤 2 至沉淀为白细胞沉淀。

3. 振荡离心管重悬白细胞沉淀。加入 230  $\mu$ l WTL Buffer, 高速振荡 30S 裂解细胞, 溶液变得粘稠, 如果溶液混匀后仍有明显凝块存在可放入 37 度水浴直至其消失。

4. (建议) 加 3  $\mu$ l 蛋白酶 K, 混匀, 放于 55 度水浴 10-30min。

5. 加 2  $\mu$ l RNase A 溶液混匀, 室温放置 10min。

6. 加入 250  $\mu$ l Buffer BL, 振荡混匀, 65 度 10min, 在此期间摇晃混匀 2 次。

7. 加 250  $\mu$ l 无水乙醇, 振荡完全混匀。假如出现看见颗粒点, 上下摇晃 10 次。

8. 把 HiBind DNA 柱套在 2ml 收集管中(已提供), 将第 7 步得到的溶液全部转入柱中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃滤液。

9. 加入 500  $\mu$ l Buffer HB 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液

10. 将 HiBind DNA 结合柱重新套回 2ml 收集管中, 加入 650  $\mu$ l DNA Wash Buffer (含乙醇) 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液;

注意: DNA Wash Buffer 使用前须按要求用无水乙醇稀释。如果放入冰箱中, 使用前须恢复到室温。

11. 将 HiBind DNA 结合柱套在新的 2ml 收集管中, 再加入 650  $\mu$ l DNA Wash Buffer (含乙醇) 至柱子中,  $\geq 8,000 \times g$  离心 1min, 弃去滤液;

12. 将 HiBind DNA 结合柱重新套回 2ml 收集管中, 最高速 ( $\geq 13,000 \times g$ ) 离心空结合柱 2min 以干燥柱子的基质; 这一步对下面的洗脱步骤至关重要。

- 将柱子置于 2ml 无核酸酶离心管，加入 500-100ul 70℃预热的 DNA Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温静置于 5min;
- 室温下，10,000×g 离心 1min，以洗脱 DNA。
- 把柱子置于另一个 1.5ml 离心管，重复用另 50-100 μl 的预热的 DNA Elution Buffer 离心洗脱，弃去柱子。将 DNA 储于-20 度。

注意：第一次洗脱可得到 60%~70%结合于柱上的 DNA，而两次洗脱的总量一般可大于 90%。然而，增加洗脱体积会减少最终产物的浓度。若想得到高浓度的 DNA，可使用 50 μl ~100 μl 的 DNA Elution Buffer 来洗脱。洗脱体积低于 50ul 将大大减少产量。另外可使用第一次洗脱液进行第二次洗脱。

### C. 血液黄层

由血液黄层是富含白细胞的部分，一般情况下，等体积的黄层的 DNA 含量会比等体积血液多 5 倍左右；制备的流程：

- 吸取适量的新鲜全血至离心管中，室温下，3,000-4,000×g 离心 10 分钟；离心后，可形成三层：上清层，为血浆层；中间层即为黄层，富含白细胞；最底层则富含红细胞。
- 小心去除上清层，用枪头小心将黄层挑出；
- 挑出的黄层细胞可直接用于该试剂盒来提取 DNA，也可以保存于-70 度。

### 产量与质量的测定

DNA 的产量可由分光光度计检测，用去离子水、Tris-HCl 或 DNA Elution Buffer 作空白对照。DNA 浓度可按以下公式计算：

$$[DNA] = (A_{260}) \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{稀释倍数}$$

DNA 的质量可通过比较在 260nm 和 280nm 处的吸光度估计得到。A260/A280 的比率在 1.7~1.9 就相当于 85%~95%的纯度。

血液是复杂的蛋白质，代谢物和许多其他物质的混合物，大约有 50%的体积是细胞，其中的 99%是红细胞，没有细胞核无法用来提取基因组 DNA，只有仅有的 0.3%的白细胞能用来提取基因组 DNA，健康的血 1ml 包含有 107

个白细胞而且含有很高的污染物，250 μl 全血能够提取 4-12 μg 的 DNA，主要决定于样品的来源，年龄等。等体积的黄层的 DNA 含量会比等体积血液多 5 倍左右。

### 常见问题及对策

出现的问题	可能的原因	建议
堵柱子	裂解不充分	加入足够量的 BL，并在 65 度孵育足够的时间，有时需要延长孵育时间 10 分钟。
	样品量过大	降低样品体积
	样品太粘稠	增加各种缓冲液体积
产量低	堵柱子	见上
	洗脱差	重复洗脱或加大洗脱体积
	洗涤不当	DNA wash buffer 须用无水乙醇进行稀释
A260/A280 偏低	洗脱步骤过分离心	可能柱子膜上的树脂掉落到洗脱液中，故不要用给定的离心速度以上的速度离心，以防树脂脱落，但这不会影响 PCR 及酶切。
	血红蛋白残留	重复步骤 1-3 RBC 裂解
	加入 WTL 后裂解细胞不完全	加入 WTL 之前确定 RBC 沉淀同 ERL 振荡混匀
无 DNA 洗脱	没有与 BL 充分混匀导致的裂解不完全	样品上柱前要与 BL 充分混匀
	上柱前没有加入乙醇	上柱前须加入乙醇，是其终浓度为 1/3
柱子中有颜色残留	Wash buffer 中没有加入乙醇	Wash buffer 使用前须加入乙醇
	没有与 BL 充分混匀导致的裂解不完全	BL 为粘稠液体，故样品须与其充分混匀
洗脱后 DNA 溶液有颜色	Wash buffer 中没有加入乙醇	Wash buffer 使用前须加入乙醇
	样品量过大	减少样品量