

D3494 Blood DNA Midi Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释 Buffer ERL 和 DNA Wash Buffer.

- Buffer ERL 为 10×浓度提供,使用前将 Buffer ERL 转移到合适的足够大的容器中,加入灭菌的去离子水稀释。

货号	加入量
D3494-00	135mL
D3494-01	630mL
D3494-03	1800mL
D3494-04	2250mL

- 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存

货号	加入量
D3494-00	40mL
D3494-01	80mL
D3494-03	160mL (每瓶)
D3494-04	200mL (每瓶)

2ml 全血的操作方案

此方案是从 2mL 全血样品中提取基因组 DNA。产量决定于样品保存方法和来源。

1. 将 2mL 的全血, 150μl OB 蛋白酶, 2.1mL Buffer BL 和 20μl RNase A 加到 15mL 的离心管中, 高速涡旋混匀 1min。
2. 65°C水浴 15-20min, 在此期间适当拿出样品摇晃混匀数次。
3. 加入 2.2mL 无水乙醇, 高速振荡 30s。
4. 将 HiBind® DNA Midi 结合柱套在 15mL 收集管(已提供)中, 将步骤 3 得到的 3.5mL 混合液转移至 HiBind® DNA Midi 结合柱中, 4,000×g 离心 5min, 弃滤液。
5. 将 HiBind® DNA Midi 结合柱套在同一个 15mL 收集管中, 将步骤 3 得到的剩余混合液转移至 HiBind® DNA Midi 结合柱中, 4,000×g 离心 5min, 弃滤液。
6. 将 HiBind® DNA Midi 结合柱套在同一个 15mL 收集管中, 加入 3mL HB Buffer, 4,000xg 离心 5min, 弃滤液。
7. 将 HiBind® DNA Midi 结合柱套在同一个 15mL 收集管中, 加入 3mL DNA Wash Buffer, 4,000xg 离心 5min, 弃滤液;

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 重复步骤 7;

9. 将 HiBind[®] DNA Midi 结合柱套在同一个 15mL 收集管中，4,000xg 空柱子离心 10-15min；

10. 将 HiBind[®] DNA Midi 结合柱套在新的 15mL 离心管（自备）中，加 500 μ l 预热至 70°C 的 Elution Buffer，室温放置 5min。

11. 4,000xg 离心 5min，洗脱 DNA。

Note：每次洗脱可以洗脱结合柱上的 60%-70% 的 DNA，第二次洗涤基因组 DNA > 80%，然而体积也增加了，所以可以用 0.5mL Elution Buffer 洗脱 2 次，洗脱体积少于 500 μ l 会减少含量。

10mL 全血的操作方案

1. 取 1 体积新鲜血液（最大不超过 10mL）加入 5 倍体积 1 \times Buffer ERL，涡旋混匀。

Note：Buffer ERL 是 10 \times 的浓缩液，使用前必须用去离子水进行稀释。

2. 冰浴 15min，在此期间拿出样品摇匀 2 次，裂解血红细胞至溶液半透明，如果血液样品中红细胞比容率很高的情况可以将冰浴时间提高到 20min。

3. 4°C，450xg 离心 10min，弃上清液。

4. 加入 2 倍样品全血体积的 Buffer ERL 洗涤沉淀，涡旋重悬沉淀。

5. 4°C，450xg 离心 10min，弃上清液，剩余大约 100 μ l 上清液留在离心管内。

6. 充分涡旋振荡，重悬沉淀。

7. 加入 2mL Buffer TL，高速涡旋混匀 20s。

8. 加入 150 μ l OB 蛋白酶涡旋混匀，放于 55°C 振荡水浴。如果没有振荡水浴，请每隔 20-30min 摇晃一次。裂解时间取决于组织类型，但通常不超过 2h。

9. 加 2.1mL Buffer BL，20 μ l RNase A，高速涡旋混匀 20s。放于 65°C 水浴 10min。出现一些纤小的沉淀物可能是 Buffer BL 引起的，但并不影响 DNA。

10. 加 2.2mL 无水乙醇（室温，96%-100%）高速涡旋混匀 30s，如果出现沉淀，可用注射器针头吸打几次；

11. 将 HiBind[®] DNA Midi 结合柱套在 15mL 离心管（已提供）中，将步骤 10 得到的 3.5mL 混合液转移至 HiBind[®] DNA Midi 结合柱中，4,000 \times g-6,000xg 离心 5min，弃滤液。

注意：HiBind[®] DNA Midi 结合柱最大的承载量为 4mL。

12. 将 HiBind[®] DNA Midi 结合柱套在同一个 15mL 离心管中，将步骤 10 得到的剩余混合液转移至 HiBind[®] DNA Midi 结合柱中，4,000xg-6,000xg 离心 5min，弃滤液。

13. 后续实验请从 2mL 全血的操作方案步骤 6 开始操作。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准