

Invitrogen DNA 提取试剂盒使用说明书

样品制备

1. 0.5ml-1.5ml 抗凝全血，静脉取血如果 24h 内用就室温保存。在 0-5°C 保存一个星期，-20°C 保存 6 个月。
2. 从 1.5ml 的新鲜外周血提取 0.5ml 的 buffer coat，这个操作在一周内完成。不能从冷冻的血液中提取 buffer coat
3. EDTA 或枸橼酸盐抗凝较好，肝素抗凝会抑制 PCR 的敏感度

试剂准备

1. 核算裂解液
 - 1.1 室温保存
 - 1.2 低于室温时会出现白色沉淀，使用前放置室温并混匀
 - 1.3 用于稀释蛋白酶
2. 蛋白酶
 - 2.1 使用前室温保存
 - 2.2 加足量的核算裂解液于蛋白酶使之溶解
 - 2.3 合适的体积分装（每个样本 125ul），-20°C 保存达 12 个月以上
 - 2.4 溶解后可在 4°C 保存 2 周以上
3. 红细胞裂解液
使用前在 0-5°C 保存
4. 90% 乙醇
使用前在 0-5°C 保存

DNA 提取

1. 在 2.0ml 的离心管加入 500ul 的全血
注：为增加得量，全血可以增加至 1.5ml，试剂的用量保持一致。
2. 加 1ml 冷冻（0°C—5°C）红细胞裂解液，混匀 30 秒（**Red cell Lysis Buffer**）
红细胞裂解液
3. 离心 1min，转速为 10000-12000 xg
4. 慢慢除去上层液，用干净的纱布将边缘擦拭干净（**底部打散**）
5. 加 1ml 冷冻（0°C—5°C）红细胞裂解液，混匀 5 秒
6. 同 3
7. 同 4
8. 加入 125 ul 含蛋白酶 4 mg/ml 的核裂解液，充分混匀 5 秒。
注意：蛋白碎片可能不完全裂解
棕色瓶 (protease) 蛋白酶
9. 将样本放在 65°C 水浴孵育 10min，在孵育过程中每 2-3min 震荡一下
10. 加 275ul 蛋白去除液到样本，摇匀 2 秒
(protein clearing solution) 蛋白清除液
11. 在 0°C—5°C 的温度下孵育 10min（冰，冰箱，或 **bench-top cooler**）
12. 大于 12000 转离心 5min
13. 慢慢移出上清液（包含 DNA），放入一个干净的带标签的 2.0ml 的试管。注意在移动的

北京思尔成生物技术有限公司

地址：北京经济技术开发区宏达北路 10 号万源商务中心 5001 室

电话：400-650-1950 传真：010-67880126-602

过程中不要将管底的蛋白和细胞碎片带移出

14. 慢慢加 500ul 的冰冻 (0°C — 5°C) 90%乙醇
 15. 反-复颠倒试管 6-10 次, 使 DNA 沉淀, 会看到细小的半透明的物质。如果没有看到 DNA 沉淀, 可以将试管放入 -20°C 冷冻 10min
 16. 离心 5min, 转速 $>12000 \text{ xg}$
 17. 慢慢将上清液倒出, 或用 1ml 的移液器将其移出, 但不要碰触管底
 18. 加 1ml 的 70%的乙醇, 摇匀 5 秒, 然后转速 $>12000 \text{ xg}$ 离心 1-2min
 19. 慢慢倒出乙醇或用 1ml 吸管将其移出, 用干净的纱布盖住开口的试管, 然后左右摇动试管 2-3min 风干 DNA, 蒸发掉乙醇。用吸水纸将周边残留的乙醇擦干
 20. 加 150ul 的 DNA 悬浮液或无菌水于试管
 21. 在 65°C 水浴或加热板孵育 15min 使 DNA 溶解
- 慢慢混匀沉淀。待检测的 DNA 用吸管上下吹打几次使之充分溶解。如果仍有未溶解的 DNA, 再放入 65°C 水浴孵育直到全部溶解