

# 操作手册

## 血清/血浆游离 DNA 提取试剂盒 (磁珠法)

Catalog No. TB476-48 (1mlx48 次反应)

### Highlights

- 可从 10ml 以内的血清/血浆，1ml 以内的羊水或脑脊液中提取到高纯度的游离 DNA。
- 获得的 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等分子生物学实验。

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	48 次
蛋白酶 K	-20°C (混匀之后)	5x20mg
蛋白酶 K 保存液	室温	5 x1ml
SP 消化液	室温	25 ml
SP DNA 结合液	室温	150 ml
SP DNA 洗涤液 1	室温	50 ml
SP DNA 洗涤液 2	室温	2x12 ml
DNA 洗脱液	室温	10 ml
游离 DNA 纯化磁珠	室温	2 ml

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

## 注意事项:

1. 环境温度低时 SP 消化液或者 SP DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 蛋白酶 K 及其保存液可常温运输。

## 特性:

- **样品种类:** 血清，血浆，羊水和脑脊液（CSF）
- **处理的体积量:** 血浆- 单次离心：最多 3ml 两次离心：最多 10ml  
血清- 最多 10ml  
羊水- 最多 1ml  
脑脊液- 最多 1ml

- **DNA 纯度:** 获得的 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于 qPCR 高通量测序等各种分子生物学实验。
- **DNA 回收情况:** 回收的 DNA $\geq$ 50bp(本试剂盒针对无细胞的 DNA 提取经过优化)，总量根据不同的样品个体差异可能会比较大。一般从血清或血浆中提取到的 DNA 浓度在 1-100 ng/ml。
- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴 (55℃)，磁力架，微型离心机或立式离心机。

### 试剂制备:

1. 使用前需要添加1ml蛋白酶K保存液到蛋白酶K (20mg)里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。混匀之后放在-20℃保存
2. 使用前需要添加48 ml 95-100%的乙醇到12ml的**SP DNA洗涤液2**中。

### 操作步骤:

#### 从 $\leq$ 5ml 的样品中提取游离 DNA

除非特殊说明，一般常温 (15-30℃) 进行以下操作步骤。

以下步骤以 200 $\mu$ l 血浆，血清或其他生物液体样品为例，当样品量发生变化的时候，只需要等比例的调整 SP 消化液，蛋白酶 K 和 SP DNA 结合液的用量就可以。磁珠用量参考下述表格

1. 添加 50 $\mu$ l 的 SP 消化液到每 200 $\mu$ l 的样品中，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
2. 添加 20 $\mu$ l 的蛋白酶 K 到每 200 $\mu$ l 的样品中，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
3. 在 55℃ 下孵育 30 分钟。
4. 添加 2 倍体积的 SP DNA 结合液到步骤 3 中消化的样品中，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
5. 添加 0.7 倍血浆样品体积的 95-100%乙醇，混匀。（根据表格 1 按照一定比例添加试剂）
6. 添加混匀的游离 DNA 纯化磁珠到上述样品中，短暂涡旋振荡后室温孵育 15-20 分钟，期间可每 5 分钟上下颠倒混匀使磁珠和核酸充分结合。孵育结束后可短暂离心以去除管盖及内壁的液体残留。

样品体积	1ml	2ml	3 ml	5 ml
SP 消化液	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	750 $\mu$ l	1.25 ml
蛋白酶 K	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l	500 $\mu$ l
混匀并且在 55℃ 下孵育 30 分钟				
SP DNA 结合液	2.7 ml	5.4 ml	8.1 ml	13.5 ml
95-100%乙醇	700 $\mu$ l	1.4 ml	2.1 ml	3.5 ml
游离 DNA 纯化磁珠	30 $\mu$ l	60 $\mu$ l	90 $\mu$ l	150 $\mu$ l
总体积	4.78ml	9.56ml	14.34ml	23.9 ml

表 1

6. 将含有上述混合物的离心管转移到一个磁力架上，静置 2-5 分钟，直到磁珠完全沉淀下来，吸弃上清液。将离心管从磁力架上移走。
7. 添加 900 $\mu$ l 的 SP DNA 洗涤液 1 到离心管中，短暂涡旋，混匀 1 分钟，使磁珠充分悬浮在 SP DNA 洗涤液 1 中。将悬液全部转移到一个干净的 1.5ml 离心管内。
8. 将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，静置 2-5 分钟，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
9. 添加 900 $\mu$ l 的 SP DNA 洗涤液 2 到 1.5ml 离心管中，混匀 1 分钟。将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
10. 重复步骤 9.
11. 将 1.5ml 离心管在室温下放置 5-10 分钟自然晾干磁珠。（如乙醇残留会对纯度有较大影响，如过度干燥则会影响洗脱效率）
12. 添加 25-50 $\mu$ l 的 DNA 洗脱液到 1.5ml 离心管中重悬磁珠，混匀磁珠 1-2 分钟，将 1.5ml 离心管移到一个磁力架上，放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。
13. 将上清（游离 DNA）转到一个干净的 1.5ml 离心管内。

注意：一般从血清血浆中提取的 DNA 总量会比较低，不推荐使用 Nanodrop 进行检测。可以使用 qPCR, Tapestation 或者 Qubit 等进行 DNA 的定量。