

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
用户需自备的试剂与物品	1
技术支持	1
质量保证	1
注意事项	2
产品介绍	2
产品的预期用途	2
操作步骤分析与说明	3
起始样本	3
样本溶解	3
选择性沉淀蛋白	3
柱纯化技术	3
DNA的回收效率与纯度	4
提高DNA的产量	4
使用前准备	5
操作流程图示	5
操作步骤	6
常见问题分析	8
附录：从其他样本中分离纯化DNA	10
从细胞中分离纯化DNA	10
从唾液中分离纯化DNA	10
从红细胞有核的血液中分离纯化DNA	10
从含有DNA的溶液中回收DNA	10
使用Simgen全血DNA小量试剂盒发表的部分论文	12

产品组成

全血 DNA 小量试剂盒 产品序号	5 次样品 3001005	50 次产品 3001050	250 次产品 3001250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
Buffer L1	2 ml	16 ml	80 ml
Buffer L2	2 ml	16 ml	80 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml	60 ml
Buffer WB（浓缩液）	1.5 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	1.2 ml	12 ml	60 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存与有效期

产品如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免样品间的交叉污染，建议选用含有滤芯的移液器吸头）
4. 一次性乳胶手套等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 可能需要使用水浴锅或恒温干浴器、自备生理盐水

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，
e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

质量保证

杭州新景生物试剂开发有限公司保证提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求。根据我们以往的经验，用户使用的样本差异是导致结果差异的最主要原因，如果需要从一些罕见的样本中分离纯化 DNA，请务必与我们的技术支持沟通后再进行实验操作。

注意事项

Buffer L1、Buffer L2和Buffer WA含刺激性化合物，操作时请戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗帮助。

产品介绍

本产品采用国家发明专利技术，可在15—20分钟内从200—400 μ l新鲜的或者是冷冻贮藏的人或动物的抗凝全血中快速分离纯化基因组DNA。本产品不使用蛋白酶K消化蛋白，裂解液Buffer L1溶解全血后，经Buffer L2沉淀去除血红蛋白。离心获得的上清中的基因组DNA可结合到纯化柱上，经Buffer WA和Buffer WB洗涤去除残留在膜上的蛋白与PCR抑制物后，基因组DNA用Buffer TE洗脱，可立即用于包括临床体外检测在内的各种分子生物学实验。

产品的预期用途

本产品适合从蛋白和核酸容易分离的样本中分离纯化DNA，比如抗凝全血、唾液、培养细胞、蛋白酶K消化产物等。某些样本虽然也可以用本试剂盒分离纯化DNA，但DNA的回收效率不是最佳，归类如下：

1. 纯化全血中的细菌DNA

全血中的细菌如果有细胞壁结构，通常不易被溶解，因此使用本试剂盒从全血中分离纯化细菌DNA的效率会很低，我们推荐使用Simgen全血细菌DNA试剂盒（Cat. No. 3004050）分离纯化全血中的细菌DNA。

2. 纯化全血中的病毒DNA

本试剂盒能同步分离纯化全血中的病毒DNA，但其效率低于Simgen全血/培养细胞DNA试剂盒（Cat. No. 3002050）。如果需要更高的病毒DNA回收效率并去除宿主基因组DNA的干扰，我们推荐使用Simgen病毒核酸纯化试剂盒（Cat. No. 4002050）从血清或者血浆中分离纯化病毒DNA。

3. 纯化血清、脑脊液、尿液等体液样本中的细胞或者病毒DNA

本试剂盒能回收体液中的细胞或者病毒DNA，但因为上述体液样本中的DNA含量极低，为了保证微量DNA的回收效率，我们推荐使用Simgen病毒核酸纯化试剂盒（Cat. No. 4002050）用于分离纯化体液样本中的细胞或者病毒DNA。

4. 纯化血凝块中的基因组DNA

将血凝块冻融一次后，吸取渗出的溶血组分400 μ l即可作为血液样本用本试剂盒提取基因组DNA。如果想更高效地从血凝块中分离纯化DNA，推荐使用Simgen血凝块DNA纯化试剂盒（Cat. No. 4201050）。

操作步骤分析与说明

1. 起始样本

样本	推荐用量
*抗凝全血	400 μ l
禽类、两栖类、鱼类、少量特殊的哺乳动物等红细胞有核生物的全血	5~10 μ l，并用生理盐水稀释到300 μ l。
唾液	300 μ l
培养细胞	300 μ l，5~10 $\times$ 10 ⁶ 个细胞的PBS细胞悬液
含DNA的溶液	300 μ l（比如蛋白酶K消化产物）

* 尽量不要使用肝素钠抗凝全血，否则提取的DNA中可能会残留有肝素钠，从而抑制PCR扩增。若肝素钠抗凝全血提取的DNA PCR扩增失败，可减少DNA模板的使用量。

2. 样本溶解

本产品不使用蛋白酶K消化蛋白，因此在加入Buffer L1后必须剧烈震荡混匀（旋涡振荡30秒）；如果样本中DNA含量太高，比如鸟类、鱼类等动物的血液被溶解后可能会成为粘稠状，则必须经过吸头多次吸注，其目的是为了更充分地促使DNA与蛋白质分离开来。剧烈的旋涡振荡或吸头吸注能提高最终DNA的回收效率。

3. 选择性沉淀蛋白

加入 Buffer L2 后将会使溶液中大部分的蛋白质沉淀下来，为了使基因组 DNA 维持在溶液中的溶解状态，避免蛋白沉淀带走基因组 DNA，此步骤也需要剧烈震荡混匀（旋涡振荡 30 秒）。沉淀的蛋白经 13000 rpm 离心 2 分钟后聚集到 1.5 ml 离心管底部，与基因组 DNA 分离开来。

4. 柱纯化技术

1) DNA 结合

将离心获取的含有 DNA 的上清液倒入纯化柱中短时离心数秒，即可使 DNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，PCR 抑制物或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。

2) 洗涤

纯化柱上通常会残留少量蛋白（如果是血液样本则残留的主要是血色素），Buffer WA 能有效地洗去这些残留的蛋白。

Buffer WB 会洗去残留在膜上的 Buffer WA，确保纯净的 DNA 吸附在纯化柱上。

DNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可，因此对离心速度和离心时间并无严格的要求，可以选用离心机中的“short run”模式运行以节约操作时间。

3) 高速空离

将洗涤后的纯化柱放回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟（如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，我们建议至少使用 12000~13000 rpm 离心 2 分钟。）的作用：

A. 使 Buffer WB 被充分地离心除去。

B. 在丢弃 Buffer WB 滤液时，如果有滤液不慎沾染到纯化柱上，也可被离心除去。

4) 洗脱 DNA

A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 洗脱 DNA，以便于 DNA 的长期稳定储存；也可以用去离子水洗脱 DNA，但是应确保去离子水的 pH 大于 7，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

B. 如果从全血中分离纯化 DNA，用于洗脱 DNA 的 Buffer TE 或者去离子水体积不应少于 60 μl 。

C. 预热的 Buffer TE 或者去离子水能提高 DNA 的洗脱效率。

D. 将 Buffer TE 或者去离子水加入纯化柱后延长静置的时间（延长至 3~5 分钟）能提高 DNA 的洗脱效率。

E. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 Buffer TE 洗脱 DNA，无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇，过度干燥的纯化柱会不利于 DNA 的洗脱。

F. 洗脱的基因组 DNA 片段在 200 bp~50 kb 之间，主要集中在 20 kb~30 kb 左右。

G. 为了产品使用的安全，如果离心机没有防泄漏的盖子，我们建议在洗脱 DNA 的时候将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以避免 1.5 ml 离心管管盖脱落。

5. DNA 的回收效率与纯度

从人或一般哺乳动物全血中回收的 DNA 量多少主要取决于血液中白细胞的数量（红细胞无核，不含 DNA），通常从 400 μl 正常人全血中能回收到 5-15 μg DNA。但如果已知血液中白细胞的数量高于正常范围，建议用 200 μl Buffer TE 洗脱 DNA，以便于充分洗脱 DNA。

DNA 的质量通常用测量 260 nm 处的光吸收值进行估算，换算方式为 1 OD 光密度相当于 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 双链 DNA 浓度。DNA 的纯度通常用 A_{260}/A_{280} 进行估算，纯净 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值应该在 1.7-1.9 之间；DNA 的盐分残留度通常用 A_{260}/A_{230} 进行估算，纯净 DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值应该在 1.8-2.5 之间。

6. 提高 DNA 的产量

如果有足够的新鲜抗凝全血，采取以下方案能使每次获得的 DNA 提高到 15 μg 或者更多。配制红细胞裂解液 (NH_4Cl 8.02 g, NaHCO_3 0.84 g, EDTA 0.37 g 溶于 1 L 水中)；或者直接购买 Simgen 红细胞裂解液 (Cat. No. 9000500)。

1) 在 15 ml 离心管中加入 8 ml 红细胞裂解液，再加入 2 ml 抗凝全血，盖上管盖后颠倒混合均匀，室温静置 5 分钟。3000 rpm (约 $3400\times g$) 离心 5 分钟。

* 如果血液体积小于 2 ml 的，可按比例减少红细胞裂解液的用量，其他条件不变。

* 尽量使用在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过两周的抗凝全血，储存时间超过两周的抗凝全血即可能出现溶血现象，不适合用红细胞裂解液分离白细胞。

2) 吸弃上清，保留管底白细胞沉淀。加入 500 μl 红细胞裂解液，勿弃吸头，直接用移液器吹打沉淀数次使白细胞悬浮起来。吸取悬浮的白细胞转移到一个 1.5 ml 离心管中，3000 rpm 离心 5 分钟。

3) 弃尽上清，加入 280 μl 生理盐水，旋涡振荡使管底的白细胞完全悬浮起来。

4) 参考附录（第 10 页）“从其他样本中分离纯化 DNA”，直接进入步骤 2 操作。

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 将 Buffer TE 在 56°C 温育（可省略）。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。

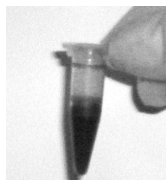


扫二维码观看操作视频

操作流程图示



加入Buffer L1，
旋涡振荡



溶解全血



加入Buffer L2，
旋涡振荡



离心2分钟



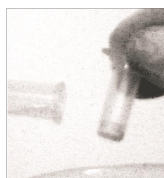
沉淀血红蛋白



上清倒入纯化柱



离心结合DNA



丢弃滤液



置回纯化柱



Buffer WA、WB
洗涤



置回纯化柱



离心甩干



放入1.5 ml离心管



离心洗脱DNA



丢弃纯化柱



纯净的DNA

操作步骤

本操作步骤是为从400 µl全血中提取DNA而设计，如果从200 µl或300 µl全血中提取DNA，**必须**按比例减少Buffer L1和Buffer L2的用量（**注意必须严格按Buffer L1：抗凝全血：Buffer L2=3:4:3**的体积比进行操作，否则将导致后续操作步骤不能进行），其他试剂用量不变。

1. 加300 µl Buffer L1到1.5 ml离心管中。
2. 加入400 µl抗凝全血，盖上管盖，剧烈摇晃3—5次，旋涡振荡30秒。

* 如果从多管血样中分离纯化DNA，可将1.5 ml离心管按顺序排列在离心管架上，用力摇晃离心管架30秒以替代旋涡振荡30秒。注意必须剧烈摇晃离心管架，并且摇晃时要用手掌按住离心管以免离心管脱落。

3. 加入300 µl Buffer L2，盖上管盖，剧烈摇晃3—5次，再旋涡振荡30秒。

* 多管操作时，可用剧烈摇晃30秒替代旋涡振荡。此步骤将出现大量血红蛋白沉淀。

4. 13000 rpm离心2分钟。

5. 将步骤4中的上清液倒入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于2 ml离心管中），盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 从某些动物血液中提取DNA，由于其血红蛋白较少，离心得到上清液的体积可能会大于纯化柱的容积，此时建议吸取800 µl上清液到核酸纯化柱中，或者将上清液分两次进行本步骤的操作。

* 纯化柱膜上如残留有血色素为正常现象，可被Buffer WA洗去。

6. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WA中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入600 µl Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

* 确认在Buffer WB中已经加入无水乙醇。

8. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，14000 rpm离心1分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的PCR效果。

9. 弃2 ml离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入100~200 µl Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

* 用56°C预热的Buffer TE洗脱DNA可提高回收效率。

* 如果离心机无防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的DNA可立即用于各种分子生物学实验，或者将DNA储存于-20°C备用。

Protocol

The following protocol is designed for 400 µl blood sample, reduce the amount of Buffer L1 and Buffer L2 in proportion if the volume of blood is between 200 - 400 µl, adjust the volume to 200 µl with physiological saline if the volume of blood is less than 200 µl (**Buffer L1 : blood : Buffer L2 = 3 : 4 : 3**).

1. Add 300 µl Buffer L1 in a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).
2. Add 400 µl anticoagulated blood. Close the lid, vigorously shake microcentrifuge tube 3 - 5 times, and then mix by vortex for 30 seconds.
3. Add 300 µl Buffer L2. Close the lid, vigorously shake microcentrifuge tube 3 - 5 times, and then mix by vortex for 30 seconds.

* A large amount of hemoglobin precipitation will appear in this step.

4. Centrifuge at 13,000 rpm for 2 minutes.
5. Placed a spin column in a 2 ml collection tube(provided), pour the supernatant from step 4 into the spin column, close the lid, and centrifuge at 12,000 rpm for 30 seconds.
6. Discard the filtrate. Place the spin column back into the 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer WA containing ethanol, close the lid and centrifuge at 12,000 rpm for 30 seconds.

* Ensure ethanol has been added into Buffer WA.

7. Discard the filtrate. Place the spin column back into the 2 ml collection tube. Add 600 µl Buffer WB containing ethanol, close the lid and centrifuge at 12,000 rpm for 30 seconds.

* Ensure ethanol has been added into Buffer WB.

8. Discard the filtrate. Place the spin column back into the 2 ml collection tube. Centrifuge at 14,000 rpm for 1 minute.

* If the full speed could not reach 14,000 rpm, centrifuge at full speed for 2 minutes.

* Do not omit this step, otherwise, it may cause problems in downstream applications due to the residual ethanol in the eluate.

9. Discard the tube containing the filtrate. Place the spin column into a new 1.5 ml collection tube (not provided). Add 100 - 200 µl prewarmed Buffer TE to the center of the membrane. Close the lid, incubate for 1 minute at room temperature, and then centrifuge at 12,000 rpm for 30 seconds.

* Recovery may be increased by 10 - 20 % if incubate longer (5 - 15 minutes) after Buffer TE addition.

10. Discard the spin column. Eluted DNA can be used in downstream applications immediately, or store at -20°C for later use.

常见问题分析

1. 回收不到DNA或者DNA的回收效率低

可能的原因:

- 1) 未按说明书指定的体积比加入Buffer L1和Buffer L2(Buffer L1:抗凝全血:Buffer L2=3:4:3)。[必须确保按正确比例加入Buffer L1 和Buffer L2。](#)
- 2) 血样中白细胞含量低，比如从化疗后的病人血样中提取DNA。经化疗后的病人体内白细胞数量降低，直接导致DNA的回收量降低。
- 3) 血液溶解步骤（步骤2）和蛋白沉淀步骤（步骤3）操作不够剧烈。温和的操作会使DNA得率降低将近一半，应确保这两个步骤操作越剧烈越好。从同一样本中提取DNA效果差异如下表，详细情况参考simgenbio微信公众号文章“提取DNA应该粗暴还是温柔？”。

样品编号	Abs260	Abs280	Abs230	260/230	260/280	样品浓度	单位	样品类型
剧烈操作	2.042	1.094	0.826	2.47	1.87	102.0792	ng/μl	dDNA
剧烈操作	2.172	1.175	0.891	2.44	1.85	108.6128	ng/μl	dDNA
温和操作	1.002	0.539	0.429	2.34	1.86	50.1038	ng/μl	dDNA
温和操作	1.131	0.605	0.437	2.59	1.87	56.5499	ng/μl	dDNA

- 4) 静置的抗凝血未混匀，相当于从不含白细胞的红细胞层吸取血液提取DNA。
- 5) 全血样品保存不当，导致全血中的DNA降解。在2~8℃冰箱放置超过两个星期的全血样本将开始出现溶血现象。如果需要继续使用血样，则应转入 - 20℃或 - 70℃冻存，否则获得的DNA将开始出现凋亡细胞的DNA带型，并且此时全血中的DNA随着时间的延长会持续分解，直至分离不到电泳可见的DNA。
- 6) Buffer WA或Buffer WB中未加入无水乙醇，应按比例补加无水乙醇。如果是错误地加入了其他试剂，请向我公司技术部寻求帮助。
- 7) Buffer WA或Buffer WB中错误地加入了70%乙醇。请向我公司技术部寻求帮助。
- 8) 错误地使用了Buffer WA和Buffer WB的洗涤顺序。确保按正确的顺序洗涤纯化柱。
- 9) DNA的洗脱效率差。参考第4页柱纯化技术中的第4点“洗脱DNA”内容优化DNA的洗脱方案。
- 10) 错误地使用了Buffer L1和Buffer L2的溶解顺序。确保按正确的顺序操作。
- 11) 样本是红细胞有核生物的全血。该种血样被溶解后非常粘稠，旋涡振荡不足以充分释放DNA，可以在Buffer L1和样本混匀后再用移液器反复吹打5~6次帮助DNA释放。

2. DNA的纯度差

- 1) A260/A280偏高，接近2.0。如果是从新鲜获取的抗凝血中提取到的DNA，应该是有RNA残留；如果不是从新鲜获取的抗凝血中提取到的DNA，应考虑是陈旧血样中的DNA已经降解成小片段DNA，或者是核苷酸的混合物，导致260 nm吸收值增高。
- 2) A260/A230偏低。如果排除未遵循Buffer L1:抗凝全血:Buffer L2=3:4:3所导致的结果，通常不影响PCR扩增。如果需要提高A260/A230的比值，参考simgenbio微信公众号文章“如何提高核酸纯度？用这2个方法就够了！”。

3. 纯化柱膜上残留有血色素

- 1) 未按说明书指定的体积比加入Buffer L1和Buffer L2(Buffer L1:抗凝全血:Buffer L2=3:4:3)
- 2) Buffer WA或Buffer WB中未加入无水乙醇，应按比例补加无水乙醇。

4. DNA电泳带型不正常



图 1

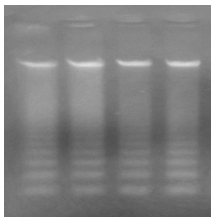


图 2

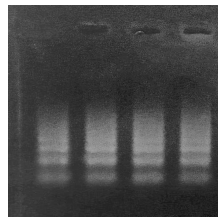


图 3

- 1) 图1是从非常新鲜（离体几小时内）的抗凝血中提取的DNA，可以观察到残留的RNA条带。RNA不能直接作为PCR模板，因而并不影响PCR扩增。如果需要去除RNA，可在加入Buffer L1时同步加入5 μ l RNase A储存液（需单独订购，Simgen Cat. No. 8001001）。
- 2) 图2是从在4℃存放超过5星期的血样中提取的DNA，可以观察到凋亡细胞的DNA条带。但是由于DNA主带仍然清晰可见，因而并不影响PCR扩增。
- 3) 图3是从在4℃存放超过2个月的血样中提取的DNA，可以观察到明显的凋亡细胞带型，而且观察不到基因组DNA的主带（靠近加样孔约20 kb~30 kb的带型）。由于DNA降解成了短片段，此时进行长片段的DNA扩增可能会失败，详细情况参考simgenbio微信公众号文章“模板DNA完整性对PCR结果的影响”。

5. 样品间交叉污染

避免样品间交叉污染的方法：

- 1) 选用含有滤芯的移液器吸头用于DNA提取。
- 2) 实验操作时勿使吸头触碰到纯化柱。
- 3) 丢弃滤液后将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次，以避免粘附在离心管管口的滤液对离心机造成的污染。
- 4) 如果手套上沾染有样本，应及时更换手套。

6. PCR扩增失败

- 1) 使用了肝素钠抗凝全血。肝素钠对PCR扩增有极强的抑制作用，提取的DNA中可能会有少量肝素钠残留，导致PCR扩增失败。可尝试减少模板DNA的使用量。
- 2) 血样没有保存好。血样没有妥善保存，导致DNA出现降解，当DNA都降解成短片段时，此时虽然能测得浓度，但进行长片段的DNA扩增可能会失败，详细情况参考simgenbio微信公众号文章“模板DNA完整性对PCR结果的影响”。

附录：从其他样本中分离纯化 DNA

1A. 从细胞中分离纯化DNA

a) 悬浮培养的细胞

用 1.5 ml 离心管 300×g 离心 5 分钟，收集 5~10×10⁶ 个细胞，弃培养基，加入 300 μl PBS 溶液悬浮沉淀。

b) 贴壁培养的细胞

用胰酶消化或者细胞刮刀刮取的方法收集 5~10×10⁶ 个细胞到 1.5 ml 离心管，300×g 离心 5 分钟，弃培养基，加入 300 μl PBS 溶液悬浮沉淀。

1B. 从唾液中分离纯化DNA

向 1.5 ml 离心管中加入 300 μl 唾液。

1C. 从红细胞有核的血液中分离纯化DNA

向 1.5 ml 离心管中加入 10 μl 抗凝全血，加入 290 μl 生理盐水使全血稀释到 300 μl。

* 鸟类、爬行类、两栖类、鱼类以及少数特殊的哺乳动物的红细胞有细胞核，勿使用超过 10 μl 全血。

1D. 从含有DNA的溶液中回收DNA

向 1.5 ml 离心管中加入 300 μ l 含有 DNA 的溶液。

* 如果含有 DNA 的溶液少于 300 μ l，补加生理盐水至 300 μ l。

* 含有 DNA 的溶液包括各种来源的生物样本的蛋白酶 K 消化产物。

2. 加入 225 μ l Buffer L1，盖上管盖，剧烈摇晃离心管 3—5 次，再旋涡振荡 30 秒混匀。

* 鸟类、鱼类等动物的血液被溶解后可能会成为粘稠状，旋涡振荡达不到 DNA 充分释放的效果，此时应该用吸头吸注血液溶解物 20 次以上以替代旋涡振荡混匀。

3. 加入 225 μ l Buffer L2，盖上管盖，剧烈摇晃离心管 3—5 次，再旋涡振荡 30 秒混匀。

4. 13000 rpm 离心 2 分钟。

* 从某些鸟类、鱼类等动物的血液中提取 DNA 时，离心后可能会观察不到沉淀，但是在液面上会有一层油状的薄膜，此时用吸头吸取下层清澈液体到核酸纯化柱中。

5. 将步骤 4 中的上清液倒入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸上倒扣拍击一次。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 100–200 μ l 56°C 温育的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机无防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验，或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

使用 Simgen 全血 DNA 小量试剂盒发表的部分论文

1. Zhu Y, Shentu X, Wang W, et al. A Chinese family with progressive childhood cataracts and IVS3+ 1G> A CRYBA3/A1 mutations[J]. Molecular vision, 2010, 16: 2347. 影响因子: 2.511
2. Zhu Y, Shentu X, Wang W. The TGFBI R555W mutation induces a new granular corneal dystrophy type I phenotype[J]. Molecular vision, 2011, 17: 225. 影响因子: 2.205
3. Zhang Z H, Lin W X, Deng M, et al. Molecular analysis of SLC25A13 gene in human peripheral blood lymphocytes: Marked transcript diversity, and the feasibility of cDNA cloning as a diagnostic tool for citrin deficiency[J]. Gene, 2012, 511(2): 227-234. 影响因子: 2.196
4. Wang K, Li Y, Dai C, et al. Characterization of the relationship between APOBEC3B deletion and ACE Alu insertion[J]. PloS one, 2013, 8(5): e64809. 影响因子: 3.534
5. Ye D, Dong F Q, Lu W Q, et al. A missense mutation in the arginine-vasopressin neurophysin-II gene causes autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus in a Chinese family[J]. Clinical endocrinology, 2013, 78(6): 920-925. 影响因子: 3.353
6. Yin H, Jin C, Fang X, et al. Molecular analysis and phenotypic study in 14 Chinese families with Bietti crystalline dystrophy[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94960. 影响因子: 3.234
7. Wang Y, Huang X F, Yang M M, et al. CFI-rs7356506 is a genetic protective factor for acute anterior uveitis in Chinese patients[J]. British Journal of Ophthalmology, 2014, 98(11): 1592-1596. 影响因子: 2.976
8. Shentu X, Miao Q, Tang X, et al. Identification and functional analysis of a novel MIP gene mutation associated with congenital cataract in a Chinese family[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126679. 影响因子: 3.057
9. Zhou C, Jin X, Tang J, et al. Association of CD40-1C/T polymorphism in the 5'-untranslated region with chronic HBV infection[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 35(1): 83-91. 影响因子: 4.652
10. Huang X F, Wang Y, Li F F, et al. CFHR2-rs2986127 as a genetic protective marker for acute anterior uveitis in Chinese patients[J]. Journal of gene medicine, 2016, 18(8): 193-198. 影响因子: 2.524
11. Wang Q F, Huang X F, Zheng Z L, et al. Association of CD59 and CFH polymorphisms with acute anterior uveitis in Chinese population[J]. Eye, 2016, 30(11): 1452-1457. 影响因子: 2.275
12. Huang X F, Mao J Y, Huang Z Q, et al. Genome-wide detection of copy number variations in unsolved inherited retinal disease[J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2017, 58(1): 424-429. 影响因子: 3.388
13. Yu X, Chen B, Zhang X, et al. Identification of seven novel ZNF469 mutations in

- keratoconus patients in a Han Chinese population[J]. Molecular vision, 2017, 23: 296. 影响因子: 2.219
14. Feng C Y, Huang X Q, Cheng X W, et al. Mutational screening of SLC39A5, LEPREL1 and LRPAP1 in a cohort of 187 high myopia patients[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 1-9. 影响因子: 4.122
 15. Lu C T, Shi Q P, Li Z J, et al. Blood glucose and insulin and correlation of SLC25A13 mutations with biochemical changes in NICCD patients[J]. Experimental Biology and Medicine, 2017, 242(12): 1271-1278. 影响因子: 2.413
 16. Rao F Q, Cai X B, Cheng F F, et al. Mutations in LRP5, FZD4, TSPAN12, NDP, ZNF408, or KIF11 genes account for 38.7% of Chinese patients with familial exudative vitreoretinopathy[J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2017, 58(5): 2623-2629. 影响因子: 3.388
 17. Lu S, Niu Z, Chen Y, et al. Repetitive element DNA methylation is associated with menopausal age[J]. Aging and disease, 2018, 9(3): 435. 影响因子: 4.232
 18. Huang X, Gong S, Ma Y, et al. Lower circulating miR-122 level in patients with HNF1A variant-induced diabetes compared with type 2 diabetes[J]. Journal of diabetes research, 2018, 2018. 影响因子: 3.04
 19. Zhuang W, Wang S, Hao J, et al. Genotype-ocular biometry correlation analysis of eight primary angle closure glaucoma susceptibility loci in a cohort from Northern China[J]. Plos one, 2018, 13(11): e0206935. 影响因子: 2.776
 20. Yu X, Ping X, Zhang X, et al. The impact of GJA8 SNPs on susceptibility to age-related cataract[J]. Human genetics, 2018, 137(11): 897-904. 影响因子: 5.207
 21. He J, Lu Y P, Li J, et al. Fetal but not maternal Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-2 gene Rs2074192 polymorphism is associated with increased risk of being a Small For Gestational Age (SGA) newborn[J]. Kidney and Blood Pressure Research, 2018, 43(5): 1596-1606. 影响因子: 2.123
 22. Xu X, Zhang X, Cui Y, et al. Three novel variants identified within ECM-related genes in Chinese Han keratoconus patients[J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 1-8. 影响因子: 4.3787
 23. Qiu C, Li C, Tong X, et al. A novel TSC1 frameshift mutation c. 1550_1551del causes tuberous sclerosis complex by aberrant splicing and nonsense-mediated mRNA degradation (NMD) simultaneously in a Chinese family[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2020, 8(10): e1410. 影响因子: 2.1828

【国家发明专利号】CN201410377744.5

【医疗器械注册证书编号】浙杭械备 20170002 号

【医疗器械生产企业许可证编号】浙杭食药监械生产备 20170004 号