

全血细菌 DNA 试剂盒说明书

产品组成

全血细菌 DNA 试剂盒 Cat. No.	5 次制备 3004005	50 次制备 3004050	250 次制备 3004250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
溶菌酶	30 mg	300 mg	1.5 g
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

溶菌酶请置于 2~8℃ 贮存。

其他物品如果储存于室温 (15~25℃)，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。

技术支持

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

产品介绍

本产品适合从 350 μl 新鲜的或者是冷冻贮藏的人或动物全血中快速分离纯化血液总 DNA。溶菌酶将全血中的细菌破壁后，裂解液溶解全血及血液中的细菌，再经 Buffer L2 沉淀去除血红蛋白，上清中的细菌 DNA 与细胞 DNA 一起吸附到纯化柱上，经 Buffer WA 和 Buffer WB 洗涤去除残留在膜上的蛋白与 PCR 抑制物后，DNA 用 Buffer TE 洗脱，并可立即用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 去离子纯水、无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管
3. 移液器吸头（为避免样品间的污染，建议选用含有滤芯的移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
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. 水浴锅或干浴锅、旋涡震荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 将水浴锅温度设置到 37℃，并将 Buffer TE 温育至 37℃。
3. 根据一次提取的标本数（按每个标本需加 50 μl 溶菌酶溶液计算）配制适量的 100 mg/ml 的溶菌酶溶液：比如要提取 10 个标本的细菌基因组 DNA，则称取 55 mg 溶菌酶干粉，加入 550 μl 去离子纯水配制成 550 μl 溶菌酶溶液。

注意：反复冻融溶菌酶溶液对其活性影响极大，如果一次配制了较多的溶菌酶溶液，应分装成小份于 -20℃ 储存，解冻使用后的溶菌酶溶液如有剩余，应予以丢弃，不可再次冻存。

4. 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作好“乙醇已加”的标记。

操作步骤：

!!! 注意事项：Buffer L1 和 Buffer L2 的用量必须精确地按 Buffer L1：溶菌酶处理后血液的体积：Buffer L2=300 μ l:400 μ l:300 μ l 的体积比进行操作，否则将导致后续步骤不能进行。

1. 在1.5 ml离心管中加入50 μ l新鲜配制的溶菌酶溶液，再加入350 μ l全血，混合均匀，37 $^{\circ}$ C水浴30分钟。

2. 加入300 μ l Buffer L1，盖上管盖，旋涡震荡30秒。

* 如果从新鲜的血液中提取DNA，可能会同时将血液中的RNA一起分离纯化出来，但是RNA的存在并不影响PCR相关的实验。如果要除去RNA污染，可在本步骤中补加4 μ l RNase A储存液（100 mg/ml，本试剂盒不提供）。

3. 加入300 μ l Buffer L2，剧烈摇晃离心管3-5次，再旋涡震荡30秒混匀。

* 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，可能离心得到上清液的体积会大于纯化柱的容积，此时建议吸取700 μ l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。

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。

* 纯化柱膜上如残留有血色素为正常现象，可被 Buffer WA 洗去。

* 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 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，在纯化柱中央加60~100 μ l 37 $^{\circ}$ C温育的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，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 $^{\circ}$ C备用。