

Charm-Pure™ 血液 gDNA 提纯试剂盒

室温保存，Proteinase K 和 RNase A 保存在 4 °C。

试剂盒组成及贮存

Charm-Pure™ 血液 DNA 提纯试剂盒可从新鲜全血或者冰冻的全血（包括加有抗凝剂的全血）中提纯 gDNA，所有的组分除了 Proteinase K 和 RNase A 需要保存在 4 °C 之外，其余组分室温保存即可。可进行 50 或者 250 次 gDNA 的提纯，其组成如下表所示：

Product Cat.	BM-148-M	BM-148-L
Purification Scale	50 次	250 次
Spin-Column with Collection Tube (CC1)	50 套	250 套
Binding Buffer (GB5)	11.0 ml	55.0 ml
Washing Buffer I (WB1)	5.5 ml	27.5 ml
Washing Buffer II (WB2)	11.0 ml	55.0 ml
Elution Buffer (EB2)	5.5 ml	27.5 ml
Proteinase K (PK2) (20 mg/ml)	0.55 ml	2.75 ml
RNase A (RA2) (20 mg/ml)	0.55 ml	2.75 ml

产品介绍

Charm-Pure™ 血液 gDNA 提纯试剂盒专为从新鲜全血或者冰冻的全血（包括加有抗凝剂的全血）中分离提纯高质量的 gDNA 而设计，操作步骤简单迅速。Charm-Pure™ 提纯系统离心柱（Spin-Column）采用改进的硅膜来选择性地吸附核酸，较常规的硅膜能更加高效地从血液中提纯高纯度的血液 gDNA。抽提缓冲液中的 DNA 分子可特异性地与硅膜相结合，而蛋白和其它污染物不被结合而保留在溶液中透过硅膜。在用 Washing Buffer 来清洗离心柱（Spin-Column）去除未结合的物质后，提纯的 gDNA 用 Elution Buffer 或水来洗脱。提纯的 gDNA 直接可用于下游反应如限制性酶切反应、SNP 分析、PCR、序列分析、全基因组扩增（WGA）和 DNA 甲基化分析等。

所需的额外材料

- 无水乙醇
- 1.5 ml 或 2.0 ml 离心管
- 移液器和吸头
- 可离 1.5 ml 或 2 ml 离心管的离心机
- 涡旋振荡器
- 水浴锅或恒温金属浴

常规防范

1. 该试剂盒仅用于实验。
2. 实验操作时需穿实验服，戴一次性手套和眼镜。避免摄取和吸入试剂，避免与试剂盒中试剂进行直接接触，一旦接触，用水彻底冲洗。
3. 提纯核酸 DNA 时，需采用适当的无菌技术来避免核酸酶的污染，使用无菌的新吸头避免交叉污染。

实验前准备

1. BM-148-M 试剂盒，加 22 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I (WB1) 中，充分混匀。BM-148-L 试剂盒，加 110 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I (WB1) 中，充分混匀。注意在瓶上做好标记表示已加乙醇！- 室温保存，加了乙醇的 WB1 在六个月之内使用。
2. BM-148-M 试剂盒，加 44 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中，充分混匀。BM-148-L 试剂盒，加 220 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中，充分混匀。注意在瓶上做好标记表示已加乙醇！- 室温保存，加了乙醇的 WB2 在六个月之内使用。
3. 在进行 gDNA 提纯实验之前，为了避免 gDNA 降解，请遵守标准的血液收集和保存程序。

操作指南

制备血液裂解液

以下步骤适用于从 200 μ l 全血中来提纯 gDNA。若需从更多的血液中提纯 gDNA，请来电咨询详细步骤。

1. 将 200 μ l 全血（新鲜全血或者冰冻的全血，加有抗凝剂或者没有加抗凝剂的全血）加到一个 1.5 - 2.0 ml 的无菌干净离心小管中。（如果量少于 200 μ l，可以加用 PBS 缓冲液到 200 μ l）。
2. 加 10 μ l RNase A 到上述血液样品中。
3. 加 10 μ l Proteinase K (PK2) 到上述混合物中，盖上盖子后，涡旋离心管 20 秒。
4. 在室温下温育 2-5 分钟。
5. 加 200 μ l Binding Buffer (GB5) 到上述混合物中，盖上盖子后，涡旋离心管 20 秒。
6. 将离心管置于 62 $^{\circ}$ C 水浴锅或金属浴中温育 30 分钟，期间颠倒混合离心管。如果愿意，也可将样品置于 52 $^{\circ}$ C 温育过夜。
7. 将离心管短暂离心，使所有的溶液集中在离心管的底部。

结合 DNA

1. 加 200 μ l 无水乙醇到混合物中，用吸头吹打溶液 10 - 15 次来混合均匀，或者盖上盖子后，涡旋离心管 20 秒（溶液体积共约有 620 μ l）。
2. 吸取 620 μ l 上述混合物到带有收集管 (Collection Tube) 的 Spin-Column 中，室温下 8000 rpm (RCF = 5800 g) 离心 1 分钟。
3. 取出 Spin-Column，将收集管中的滤液予以丢弃，将 Spin-Column 重新插入到收集管中（如果在 Spin-Column 中还有液体，再离心 1 分钟，使所有的液体滤过小柱）。

清洗 DNA

1. 向 Spin-Column 中加 500 μ l 含有乙醇的 Wash Buffer I (WB1)。
2. 将带有收集管的 Spin-Column 以最大转速 (≥ 13000 rpm 或 16000 g) 室温离心 1 分钟, 倒掉收集管中滤液。
3. 向 Spin-Column 中加 500 μ l 含有乙醇的 Wash Buffer II (WB2)。
4. 将带有收集管的 Spin-Column 以最大转速 (≥ 13000 rpm 或 16000 g) 室温离心 1 分钟, 倒掉收集管中滤液。
5. 重复步骤 3 和 4, 即用 Wash Buffer II (WB2) 洗两次。
6. 以最大转速将带有收集管的 Spin-Column 离心 1 分钟来彻底去除含有乙醇的 Wash Buffer, 丢掉收集管。将 Spin-Column 放入一个干净的 1.5 ml 离心管中。(在转移 Spin-Column 时, 注意避免残留的 Wash buffer 接触到 Spin-Column 的尖端。)

gDNA 的洗脱

1. 根据样品的数量, 取一定体积的 Elution Buffer (EB2) 到 1.5 ml 离心管中, 置于 72 $^{\circ}$ C 金属浴或水浴中加热。
2. 向 Spin-column 的膜中央, 加 50 μ l 预热的 Elution Buffer (EB2), 室温下至少静置 1 分钟。
3. 室温下最大速度离心 1 分钟。1.5 ml 离心管中的收集的滤液即为纯化的 gDNA。如果有需要, 可用 50 μ l Elution Buffer (EB2) 进行再次洗脱。这一步可增加产量 15-30%, 但提纯的 gDNA 因为体积增大, 终浓度会降低。
4. 洗脱到离心管中的 gDNA 可直接用于下游各种分子生物实验反应, 或者置于 4 $^{\circ}$ C 短期保存或 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

电泳及下游的应用

提纯的 gDNA 可用琼脂糖凝胶电泳进行质检 (建议取 5 - 8 μ l 提纯的 gDNA 进行电泳检测)。可用分光光度计或荧光标记法或其它定量方法来测定产量。纯化的 gDNA 可直接用于下游反应, 如限制性酶切反应、引物延伸、SNP 分析、PCR、STR 分析、DNA 序列分析、全基因组扩增 (WGA) 及其它分子实验操作。

常见问题及解决方案

问题	原因	解决方案
DNA 产量低	起始材料质量差	确保严格遵守手册推荐的血液样品收集和保存程序。
	裂解不彻底	如果 Proteinase K 裂解不彻底, 62 $^{\circ}$ C 温育时间延长 15-30 分钟。
PCR 没有产物	PCR 反应液中漏加组分	确保加了所有的组分。核对 PCR 反应的阳性对照和阴性对照。