

Charm-Pure™ 血液保存卡（血卡）gDNA 提纯试剂盒

室温保存，Proteinase K 保存在 4 °C。

试剂盒组成及贮存

Charm-Pure™ 血卡 DNA 提纯试剂盒可从 Charm-Protect 血液保存卡（血卡）中提纯 gDNA，其组成如下表所示。所有的组分除了 Proteinase K 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。

Product Cat.	BT-137-M	BT-137-L
Purification Scale	50 次	250 次
Filter Basket (FB2)	50 个	250 个
Spin-Column with Collection Tube (CC1)	50 套	250 套
Binding Buffer (GB4)	22.0 ml	110.0 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)	1.1 ml	5.5 ml

产品介绍

Charm-Pure™ 血卡 gDNA 提纯试剂盒专为从 Charm-Protect 血卡或者血片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卡中提纯高纯度的血液 gDNA。抽提缓冲液中的 DNA 分子可特异性地与改进后的硅膜相结合，而蛋白和其它污染物不被结合而保留在溶液中透过硅膜。用 Washing Buffer 来清洗离心柱（Spin-Column），去除未结合的物质，提纯的 DNA 可用 Elution Buffer 或水来洗脱。每张血纸片（血纸片的直径约为 1/4 英寸）可提纯 300 ng ~ 1200 ng gDNA，其 A260/A280 值在 1.7 – 2.0 之间。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

- 武汉昌美生物技术有限公司生产的 Charm-Protect 血液保存卡（血卡）（货号：BC20， BC 200）或者血液保存片（血片）（货号：BD-60， BD-300， BD-3）
- 可离 1.5ml 或 2ml 离心管的离心机
- 涡旋振荡器
- 镊子
- 水浴锅或恒温金属浴
- 打孔器（每孔的直径约为 1/4 英寸，这样，打出的每张血卡的纸片的直径约为 1/4 英寸）

常规防范

1. 该试剂盒仅用于实验。
2. 实验操作时穿实验服，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皮肤接触，一旦接触，用水彻底冲洗。
3. 提纯核酸时，需采用适当的无菌技术来避免核酸酶的污染，使用无菌新吸头避免交叉污染。

实验前准备

1. BT-137-M 试剂盒，加 22 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I（WB1）中，充分混匀。BT-137-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. BT-137-M 试剂盒，加 44 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II（WB2）中，充分混匀。BT-137-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

制备血卡裂解液

以下步骤适用于用打孔器从血卡中打出的三张血片（每张血纸片的直径约为 1/4 英寸）。若需从更多的血片中提纯 gDNA，请来电咨询详细步骤。

1. 用打孔器在血卡圆圈内打孔，取出打下的血纸片，一共打下 3 张血纸片。
2. 将三张打下的含有血液的血纸片放入一个 1.5 ml 或 2.0 ml 离心管中（如使用我公司的血片，血片已在离心管中，直接进行后续操作。）。
3. 向离心管中加 300 μ l 干净的无菌水。
4. 加 20 μ l Proteinase K（PK2）到上述混合物中，盖上盖子后，涡旋离心管 20 秒。

5. 将离心管置于 62 °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 °C 温育过夜。
6. 将离心管短暂离心，使所有的溶液集中在管底。
7. 将 Filter Basket (FB2) 放入到一个干净的离心管中，将上步所得溶液转移到 Filter Basket (FB2) 中，再用镊子将血纸片也转移到这个 Filter Basket (FB2) 中（注意：镊子在使用后需用去离子水和 100% 乙醇清洗，避免交叉污染。）。
8. 将带有 Filter Basket (FB2) 的离心管在室温下以最大转速 (≥ 13000 rpm 或 16000 g) 离心 30 秒。
9. 加 100 μ l 干净的无菌水到 Filter Basket (FB2) 中的血纸片上，室温下温育 1 分钟。
10. 将带有 Filter Basket (FB2) 的离心管在室温下以最大转速 (≥ 13000 rpm 或 16000 g) 离心 30 秒，去掉 Filter Basket (FB2)，保留好收集管底的溶液（约 420 μ l）。

结合 DNA

1. 加 400 μ l Binding Buffer (GB4) 到上步所得溶液中，混合均匀。加 400 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（溶液体积共约有 1220 μ l）。
2. 吸取 610 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。
4. 吸取余下的 610 μ l 上述混合物到同样的 Spin-Column 中，室温下 8000 rpm (RCF = 5800 g) 离心 1 分钟。
5. 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。

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。

- 以最大转速将带有收集管的 Spin-Column 离心 1 分钟，以彻底去除 Wash Buffer II。丢掉收集管，将 Spin-Column 放入干净的 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

- 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 °C 金属浴或水浴中加热。
- 向 Spin-Column 的膜中央，加 50 µl 预热的 10 mM Tris Elution Buffer (EB2)，室温下静置至少 1 分钟。
- 室温下最大速度离心 1 分钟，收集在 1.5 ml 离心管中的滤液即为纯化的 gDNA。注意：如果需要，可用 50 µl 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。
- 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 °C 短期保存或 -20 °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 µl 提纯的 DNA 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量产量。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 °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。

©2016 武汉昌美生物 (Wuhan Charm Biotech.) Confidential, all rights reserved. More information from www.wuhancharmbiotech.com

不需要 gDNA 提纯可直接进行 PCR/STR 实验

血液保存卡中储存的 gDNA 不需要提纯可直接用于 PCR/STR 实验。操作步骤如下：

1. 取一张含有血液的血纸片到一个 1.5 ml 或 2.0 ml 离心管中，向管中加 100 μ l 干净的无菌水。
2. 盖上盖子后，涡旋震荡离心管 20 秒。
3. 将管子置于水浴或金属浴中 62 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟（注意：不要加 Proteinase K）。
4. 将离心管短暂离心，使所有的溶液集中在管底。
5. 取出一定体积的上述溶液，用干净的无菌水或 TE 缓冲液稀释 10 倍（如取 10 μ l 溶液到 90 μ l 水中，混合均匀）。
6. 加 2-3 μ l 稀释后的溶液作为模板加到 50 μ l PCR 反应体系中，进行常规的 PCR 反应。