

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	5
准备工作	5
方案 1:1ml 血液 DNA 中量提取	6
方案 2:2ml 血液 DNA 中量提取	8
方案 3:3ml 血液 DNA 中量提取	10
方案 4:5ml 血液 DNA 大量提取	12
方案 5:10ml 血液 DNA 大量提取	14
常见问题回答	16

版本: 2019-01

简介

HiPureBlood DNA Kits 为血液、血清、血浆、牛奶、唾液、或其它液体样品以及培养细胞的总 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30 分钟。由于试剂盒对全血或液体样品直接裂解和消化，因而纯化的 DNA，包括基因组 DNA，线粒体 DNA，病毒 DNA(如乙肝)，或其它寄生微生物的 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern blot, 病毒 DNA 检测等实验。

试剂盒	Mini Kit	Midi Kit I	Midi Kit II	Midi Kit III	Maxi Kit	96 Kit
编号	D3111	D3112	D3113	D3114	D3115	D3116
样品用量	250 µl	1 ml	2 ml	3 ml	5-10 ml	200 µl
样品类型	新鲜或冻藏全血，血清，血浆，分泌物，牛奶等液体样品，培养细胞					
结合能力	100 µg	250 µg	500 µg	500 µg	2 mg	50 µg
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱	15 ml 柱	15 ml 柱	50 ml 柱	96 孔板

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer AE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。试剂盒基于硅胶柱纯化方式。血液或其它液体样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随滤液流出去除。柱子经 Buffer DW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer DW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer AE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、病毒检测等实验。

保质期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月)建议放置于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。低温下，Buffer AL 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

组 成

HiPure Blood DNA Midi Kit I

产品编号	D3112-01	D3112-02	D3112-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer AL	6 ml	15 ml	60 ml
Buffer DW1	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer AE	1.8 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer DW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

HiPure Blood DNA Midi Kit II

产品编号	D3113-01	D3113-02	D3113-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer AL	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW1	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	12 mg	50 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer DW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

组 成

HiPure Blood DNA Midi Kit III

产品编号	D3114-01	D3114-02	D3114-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
1.5ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer AL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer DW1	10 ml	50 ml	180 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	12 mg	70 mg	340 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	25 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer DW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

HiPure Blood DNA Maxi Kit

产品编号	D3115-01	D3115-02	D3115-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer AL	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer DW1	40 ml	180 ml	2 x 420 ml
Buffer DW2*	20 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Proteinase K	24 mg	120 mg	560 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
Buffer AE	15 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

*: Buffer DW2 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 移液枪头
- (可选) 50mg/ml RNase A Solution
- 小型离心管(10,000 × g)或大型桶状离心管(5000rpm)
- 70℃水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在 2~8℃保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- Buffer DW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer RBC(另外订购), 处理附加流程时, 才需另外订购。

方案 1. 1ml 血液 DNA 中量提取(D3112)

该方案适合于从≤1ml 抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取总 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化,获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞)、线粒体 DNA、游离的 DNA(>100bp)、以及病毒 DNA(如乙肝)和微生物 DNA。若样品体积小于 1ml,可用 Buffer AE 调整至 1ml。

1. 在 15ml 离心管中,加入 100 μ l Proteinase K。
2. **转移≤1ml 抗凝的血液,血清,血浆,牛奶,唾液,或其它液体样品至装有蛋白酶的离心管中,振荡混匀。**若样品小于 1ml,用 PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 1ml。若需要从 DNA 含量很低的样品如血清、血浆,尿液中提取 DNA,加入 5 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)至样品中以提高得到率。
3. **加入 1ml Buffer AL 至样品中。**盖好盖子,颠倒混匀 3~5 次,最高速度涡旋 1 分钟。70℃水浴 10 分钟,其间颠倒或涡旋混匀 2~3 次。
由于 Buffer AL 非常粘稠,涡旋时须让裂解液与血液充分混匀。转移 Buffer AL 时,先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA,加入 10 μ l RNase Solution 至裂解液中,室温静置 10 分钟。
4. **加入 1ml 无水乙醇至样品中。**最高速度涡旋 1 分钟。短暂离心收集管壁的液滴。
5. 把 DNA 中量柱装在 15ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**5,000rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液,把柱子重新装回收集管中。**加入 2ml Buffer DW1 至柱子上。**5,000 rpm 离心 3 分钟。
7. 弃流出液,把柱子重新装回收集管中。**加入 3ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中,**5,000 rpm 离心 3 分钟。
Buffer GW2 在使用之前,必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. 倒弃流出液,把柱子重新装回收集管中。**加入 3ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中,**5,000 rpm 离心 3 分钟。
9. 倒弃流出液,把柱子重新装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 10 分钟,以甩干柱子的基质。这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。

10. 将柱子转移至新的 15ml 灭菌的离心管(自配)。加入 200 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。

11. 再加入 200 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。

DNA 柱子最小洗脱体积是 200 μ l, 小于 200 μ l 会导致洗脱效率下降。处理 DNA 含量很低的样品, 如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。若纯化的 DNA 需要长期保存, 建议用 Buffer AE (10mM Tris pH9.0, 0.5mM EDTA)来洗脱 DNA。

12. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

附加方案: 处理 1-3ml 的血液 DNA 抽提

(注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)

1. 转移 1-3ml 抗凝血液样品至 15ml 离心管中。
2. 加入 3 倍体积 1 X Buffer RBC 至样品中, 颠倒混匀 5 次。
3. 2,000 x g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液, 并反扣于吸水纸上吸尽残液。倒弃上清液时, 小心不要倒弃细胞沉淀。
4. 加入 1000 μ l 灭菌水和 100 μ l 蛋白酶 K 至样品中, 涡旋 30 秒打散沉淀团。
5. 按第 9 页的第 3~12 步进行操作。

方案 2. 2ml 血液 DNA 中量提取 (D3113)

该方案适合于从 $\leq 2\text{ml}$ 人类的抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化，获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞)、线粒体 DNA、游离的 DNA、以及病毒 DNA(如乙肝)和微生物 DNA。若样品体积小于 2ml，可用 Buffer AE 调整至 2ml；

1. 在 15ml 离心管中，加入 200 μl Proteinase K。
2. **转移 $\leq 2\text{ml}$ 抗凝血液，血清，血浆，牛奶，唾液，或其它体液样品至装有蛋白酶的离心管中，振荡混匀。**若样品小于 2ml，用 PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 2 ml。若需要从 DNA 含量较低的样品如血清、血浆，尿液等中提取细胞 DNA、病毒 DNA 或游离 DNA 时，我们推荐加入 5 μl Carrier RNA(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)至样品中以提高其回收效率。

3. **加入 2.1ml Buffer AL 至样品中。**盖好盖子，颠倒混匀 3~5 次，最高速度涡旋 1 分钟。65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 分钟，其间涡旋混匀 3~5 次。

由于 Buffer AL 非常粘稠，涡旋时须让裂解液与血液充分混匀。转移 Buffer AL 时，先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA，加入 20 μl RNase Solution 至裂解液中，室温静置 10 分钟。

4. **加入 2.1 ml 无水乙醇至样品中。**立即于最高速度涡旋 60 秒。
5. 把 DNA 中量柱装在 15ml 收集管中。**转移一半混合液至柱子中。**5,000 rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。5,000 rpm 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3ml Buffer DW1 至柱子上。**5,000 rpm 离心 3 分钟。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3.5ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)**至柱子中，5,000 rpm 离心 3 分钟。
Buffer DW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3.5ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)**

至柱子中， 5,000 rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 15 分钟，以甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 15ml 灭菌的离心管(自配)。加入 400 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。
12. 再加入 400 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。
DNA 柱子最小洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 40~60% DNA；二次洗脱可洗脱出 70~90% 的 DNA。处理 DNA 含量很低的样品，如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。若纯化的 DNA 需要长期保存，建议用 Buffer AE(10mM Tris pH9.0, 0.5mM EDTA)来洗脱 DNA。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

附加方案：处理 2-3ml 的血液 DNA 抽提

(注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)

1. 转移 2-3ml 抗凝血液样品至 15ml 离心管中。
2. 加入 3 倍体积 Buffer RBC 至样品中，颠倒混匀 5 次。
3. 2,000 x g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液，并反扣于吸水纸上吸尽残液。
注：倒弃上清液时，小心不要倒弃细胞沉淀。
4. 加入 2 ml 灭菌水和 0.2ml 蛋白酶 K，涡旋 30 秒打散沉淀团。
5. 按第 11 页的第 3~13 步进行操作。

方案 3. 3ml 血液 DNA 中量提取(D3114)

该方案适合于从≤3ml 人类的抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化，获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞)、线粒体 DNA、游离的 DNA、以及病毒 DNA(如乙肝)和微生物 DNA。若样品体积小于 3ml，可用 Buffer AE 调整至 3ml；

1. 在 15ml 离心管中，加入 300 μ l Proteinase K。
2. **转移≤3ml 抗凝的血液，血清，血浆或其它体液样品至装有蛋白酶的离心管中，振荡混匀。**若样品小于 3ml，用 PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 3 ml。若需要从 DNA 含量较低的样品如血清、血浆，尿液等中提取病毒 DNA 或游离 DNA 时，我们推荐加入 5 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)至样品中以提高其回收效率。
3. **加入 3.2ml Buffer AL 至样品中。**盖上盖子，颠倒混匀 3~5 次，然后最高速度涡旋 1 分钟。65℃ 水浴 30 分钟，其间涡旋混匀 3~5 次。
由于 Buffer AL 非常粘稠，涡旋时须让裂解液与血液充分混匀。转移 Buffer AL 时，先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA，加入 30 μ l RNase Solution 至裂解液中，室温静置 10 分钟。
4. **加入 3.2ml 无水乙醇至样品中。**立即于最高速度涡旋 1 分钟。
5. 把中量柱装在 15ml 收集管中。**转移 4ml 混合液至柱子中。**5,000 rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。继续转移 4ml 混合液至柱子中。5,000rpm 离心 3 分钟。重复此步直至所有混合液都转移至柱子中过滤完毕。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3ml Buffer DW1 至柱子上。**5,000 rpm 离心 5 分钟。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3.5ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**5,000 rpm 离心 5 分钟。
Buffer DW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 3.5ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**5,000 rpm 离心 5 分钟。

10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 15 分钟，以甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 15ml 灭菌的离心管(自配)。加入 500 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。
12. 再加入 500 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

DNA 柱子最小洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 30-50% DNA；二次洗脱可洗脱出 60~80% 的 DNA。处理 DNA 含量很低的样品，如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。若获得的 DNA 产量还偏低，可再重复第 12 步进行第三次洗脱。若纯化的 DNA 需要长期保存，建议用 Buffer AE(10mM Tris pH9.0, 0.5mM EDTA)来洗脱 DNA。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

附加方案：处理 3-5ml 的血液 DNA 抽提

(注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)

1. 转移 3~5ml 抗凝血液样品至 50ml 离心管中。
2. 加入 3 倍体积 Buffer RBC 至样品中，颠倒混匀 5 次。
3. 2,000 \times g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液，并反扣于吸水纸上吸尽残液。

注：倒弃上清液时，小心不要倒弃细胞沉淀。
4. 加入 3 ml 灭菌水和 0.3ml 蛋白酶 K 至样品中。涡旋 30 秒打散沉淀团。
5. 按第 13 页的第 3-13 步进行操作。

方案 4. 5ml 血液 DNA 大量提取(D3115)

该方案适合于从≤5ml 人类的抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取总 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化，获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞)、线粒体 DNA、游离的 DNA(>100bp)、以及病毒 DNA(如乙肝)和微生物 DNA。若样品体积小于 5ml，可用 Buffer AE 调整至 5ml；

1. 在 50ml 离心管中，加入 500 μ l Proteinase K。
2. **转移≤5ml 抗凝的血液，血清，血浆或其它体液样品至蛋白酶的离心管中。**轻轻振荡混匀。若血液小于 5ml，用 PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 5ml。
3. **加入 5.5ml Buffer AL 至样品中。**盖上盖子，颠倒 3~5 次。最高速度涡旋混匀 60 秒。65℃水浴 30 分钟。其间涡旋混匀 2~3 次。
由于 Buffer AL 非常粘稠，涡旋时须让裂解液与血液充分混匀。转移 Buffer AL 时，先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA，加入 50 μ l RNase Solution 至裂解液中，室温静置 10 分钟。
4. **加入 5.5ml 无水乙醇至样品中。**盖上盖子，快速颠倒 3~5 次。最高速度涡旋混匀 30 秒。
5. 把 DNA 大量结合柱装在 50ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**3,000rpm 离心 5 分钟。
6. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 10ml Buffer DW1 至柱子上。**3,000 rpm 离心 5 分钟。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)**至柱子中，3,000 rpm 离心 5 分钟。
Buffer DW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)**至柱子中，3,000 rpm 离心 5 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 15 分钟，以甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。(这一步要尽量提高离心速度以减少乙醇的残留，但是离心速度不能超过 5000rpm)。

10. 将柱子转移至新的 50ml 灭菌的离心管(自配)。加入 700 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

11. 再加入 700 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

DNA 柱子最小洗脱体积是 700 μ l, 小于 700 μ l 会导致洗脱效率下降。处理 DNA 含量很低的样品, 如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。若纯化的 DNA 需要长期保存, 建议用 Buffer AE (10mM Tris pH9.0, 0.5mM EDTA)来洗脱 DNA。

12. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

附加方案: 处理 5-10ml 的血液 DNA 抽提

(注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)

1. 转移 5~10ml 抗凝血液样品至 50ml 离心管中。
2. 加入 2.5 倍体积 Buffer RBC 至样品中, 颠倒混匀 5 次。
3. 2,000 \times g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液, 并反扣于吸水纸上吸尽残液。
注: 倒弃上清液时, 小心不要倒弃细胞核沉淀。
4. 加入 5 ml 灭菌水和 0.5ml 蛋白酶 K 到样品中。涡旋 30 秒打散沉淀团。
5. 按第 15 页的第 3 步进行操作。

方案 5. 10ml 血液 DNA 大量提取(D3115)

该方案适合于从≤10ml 人类的抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化，获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞)、线粒体 DNA、游离的 DNA、以及病毒 DNA(如乙肝)和微生物 DNA。若样品体积小于 10ml，可用 Buffer AE 调整至 10ml；

1. 在 50ml 离心管中，加入 500 μ l Proteinase K。
2. **转移≤10ml 抗凝血液，血清，血浆或体液样品至装有蛋白酶的离心管中**，轻轻振荡混匀。若血液小于 10ml，用 PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 10ml。
3. **加入 10ml Buffer AL 至样品中**。盖上盖子，颠倒几次。然后最高速度涡旋 60 秒混匀。65℃水浴 30 分钟，其间涡旋混匀 2 次。
由于 Buffer AL 非常粘稠，涡旋时须让裂解液与血液充分混匀。转移 Buffer AL 时，先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA，加入 50 μ l RNase Solution 至裂解液中，室温静置 10 分钟。
4. **加入 10ml 无水乙醇至样品中**。立即盖上盖子，颠倒几次。涡旋混匀 60 秒。
5. 把 DNA 大量结合柱装在收集管。**转移一半混合液至柱子中**。5,000rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。把剩余混合液转移至柱子中。5,000 rpm 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer DW1 至柱子上**。5,000 rpm 离心 5 分钟。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，5,000 rpm 离心 5 分钟。
注：Buffer DW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 15ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，5,000 rpm 离心 5 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 15 分钟，以甩干柱

子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。(这一步要尽量提高离心速度以减少乙醇的残留，但是离心速度不能超过 8000rpm)。

11. 将柱子转移至新的 50ml 灭菌的离心管(自配)。加入 700 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

12. 再加入 700 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。室温放置 5 分钟。5,000 rpm 离心 5 分钟。

DNA 柱子最小洗脱体积是 700 μ l，小于 700 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 40-60% DNA；二次洗脱可洗脱出 70-90% 的 DNA。处理 DNA 含量很低的样品，如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。若纯化的 DNA 需要长期保存，建议用 Buffer AE(10mM Tris pH9.0, 0.5mM EDTA)来洗脱 DNA。

13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 溶液带颜色	
样品裂解不充分	血液与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
血液放置过程有凝血块	处理陈旧的血液样品时，加大蛋白酶的用量，或用附加方案进行提取
DNA 产量低	
样品 DNA 含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩于 250 μ l。重新提取时在 Buffer AL 中加入 2 μ l Carrier RNA 提高得取率。
柱子堵塞	样品用量太多
样品裂解不充分	血液与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 70 $^{\circ}$ C，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。进行第三步洗脱。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
OD260/OD280 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNASE 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间
加入 Buffer AL 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3-5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
Buffer DW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。