

EchoLUTION血液DNA高产量试剂盒说明书

本操作流程用于从>200µl的液体血液样本中一步纯化基因组DNA，适用于200µl到1000µl（新鲜、稳定或冷冻）人或动物全血（稳定：EDTA、柠檬酸盐或肝素）。该套试剂盒包含一种新型色谱柱，其中密封阀集成在帽盖处。阀门可同时防止来自外部的DNA制剂污染。

所需材料和设备

- 每组200µl至1000µl的血液样本；
- 带转子的微型离心机，（1.5和2ml离心管）；
注意事项：切换到相对离心力， rcf ($x g^*$)；若无此功能，请使用以下公式
- 加速反应效率：恒温混匀仪，能够通过搅拌加热至60°C；预热至60°C。或者：加热块，预热至60°C；
- 涡旋震荡器；
- 每个样品备一个反应管（1.5或2.0 ml），用于裂解（最好带安全帽）；
- 每个样品备一个反应管（2 ml），用于柱制备；
- 每个样品备一个反应管（1.5 ml），用于洗脱和收集纯化DNA；
- 10µl、200µl和1000µl刻度的移液管，相应的移液管枪头；
- 快速开盖小工具（操作流程1）：穿帽器（BioEcho产品编号050-001-001）；

实验前准备

- 将恒温混匀仪或热块加热至60°C；
- 将微型离心机设置为2000 $x g^*$ ；
注意事项：切换到相对离心力，而不是转速。

操作流程1：使用穿帽器进行纯化

裂解

1. 轻摇血样使混匀，随后将每个血样转移到反应管中（最好带安全帽）并根据下表添加红细胞裂解缓冲液HY (ELB)

血液样本量	200 – 500 µl	> 500 µl
反应管容量	1.5 ml 管	2.0ml管
Add (ELB) ad **	最终体积1.3ml	最终体积2.0ml

**例如，如果从300µl血液开始，添加1000µl ELB 通过涡旋震荡混合，并在室温下孵育3分钟，以进行红细胞裂解。浑浊度降低表明裂解完成。

2. 以2000 $x g^*$ 的速度离心白细胞1分钟，并完全去除上清液。如果出现以下情况，则重复步骤1和2一次（使用ELB重新悬浮细胞颗粒）：

- 血样体积>500µl
- 白细胞颗粒不清晰可见（例如：使用长时间保存的血液样本）

3. 涡旋震荡样品管使血液裂解缓冲液 (HY)，(LB)再悬浮。如果两个及两个以上样品一起制备预混合液，最终体积比所需体积要大10%（见表）。

样品数量	1	6 (+10%)	12 (+10%)	自己的
(P) TurboLyse HY 蛋白酶混合物	25	165	330	
(LB) 血液裂解缓冲液(µl)	55	363	726	
最终体积(µl)	80	528	1056	

4. 向白细胞颗粒中添加25ul (P)和55ul (LB) (80ul预混合)，并通过涡旋震荡在60°C下摇动培养5分钟。或者，温育10分钟，温育期间摇匀两次。
在裂解过程中，继续进行“柱制备”步骤5（见下文）。

柱制备

5. 短暂涡旋震荡EchoLUTION色谱柱，并将其放入2ml反应管中。静置约10-20分钟。
6. 使用穿帽器（扫描二维码观看视频）：在立柱盖子上打孔，并将柱连同盖打孔机一起从2 ml反应管中取出。掰下立柱的底部封盖，并拆下穿帽器。将色谱柱放入2ml反应管中。
7. 以1000x g^* 离心1 分钟。丢弃装有缓冲液的2ml反应管。离心后不要重新关闭柱盖。
8. 将制备好的色谱柱放入一个新的5ml反应管中，用于洗脱溶液提取并放回支架中。继续“纯化”（见下文）。

纯化

9. A执行步骤4后，向每个样品中添加10µl的洗涤溶液HY (CS) 涡旋震荡10秒。样品会变得混浊。
10. 注：由于含有内源性核糖核酸酶，不需要添加核糖核酸酶。
当样品量≥ 500ul血液时，使用200ul枪头用力上下吹打至少10次。确保完全重悬微粒，并减少操作过程中的粘度。
11. 以最大速度离心2分钟。
12. 如图所示，将含有DNA的上清液（80至最大110µl）转移到步骤8制备的色谱柱上：



将移液管尖端垂直插入纯化柱盖孔，直到强行通过盖阀（轻微压力释放；否则，重新插入移液管尖端）。用移液管缓慢（5秒）将样品移入色谱柱

13. 以1000 $x g^*$ 离心1分钟。纯化的DNA（约95µl，特异性献血者）流经色谱柱进入1.5 ml洗脱管。丢弃色谱柱。洗脱的DNA可立即使用，或在4°C下储存，或在-20摄氏度长期储存。或进行分光光度分析，随附的1x Tris缓冲液 (T) 作为空白使用。

操作流程2: 无需穿帽器的纯化

裂解

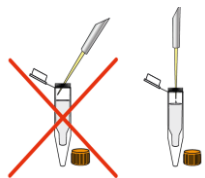
1. 执行操作流程1中的步骤1-4。

柱制备

5. 短暂涡旋震荡EchoLUTION色谱柱, 并将其放入2ml反应管中。让静置约10-20分钟(建议在裂解步骤中)。
6. 将色谱柱的螺帽拧松半圈, 然后掰下底部封盖。
注意事项: 不要关紧色谱柱的螺帽。螺帽必须保持松开半圈不动以避免产生真空。将该柱放回原2 ml反应管里, 并将两者都放入离心机。
7. 以1000 x g*离心1分钟。丢弃含有缓冲液的2ml反应管。离心后不要重新关紧柱盖。
8. 将制备好的色谱柱放入一个新的1.5 ml反应管中, 用于洗脱溶液提取DNA样本, 并放回支架中。
继续“纯化”(下文)。

纯化

9. 执行步骤4后, 向每个样品中添加10μl洗脱溶液HY^{CS}。涡旋震荡10秒混合。样品会变得混浊。
10. 通过移液管上下吹打至少10次使样品均匀化。
11. 以最大速度离心2分钟。
12. 将含有DNA的上清液(80至最大110μl)转移到步骤8制备的色谱柱上, 如图所示:



打开瓶盖, 用移液管缓慢(5秒)将样品移到准备好的色谱柱树脂层中心。关紧螺帽并再次松开半圈。
注意事项: 不要关紧色谱柱的螺帽!

13. 以1000 x g*离心1分钟。纯化的基因组DNA(约95μl, 特异性献血者)通过色谱柱流入1.5 ml洗脱管。丢弃色谱柱。

产品使用限制

EchoLUTION血液DNA HY试剂盒仅供研究使用。它没有注册或注册被授权用于诊断、预防或治疗疾病

*计算rcf到rpm的转换。

*大多数离心机提供rpm和g-force (rcf) 之间的选择; 如果不是, 则计算与重力匹配的转速使用以下公式: $rpm = 1,000 \times \sqrt{rcf}$, r=转子半径, 单位为mm。g为所需的g力。例如: 半径为150 mm时, 1000 x g的相应转速约为2400 rpm。

用于从>200μl的液体血液样本中一步纯化基因组DNA

产品编号 (rxn)	010-011-010 (10)	010-011-050 (50)	010-011-250 (2x125)
试剂盒内容	红细胞裂解缓冲液、血液裂解缓冲液HY、洗涤液HY、, TurboLyse HY蛋白酶, 1x Tris缓冲液, 色谱柱		

快速操作流程1

裂解和样品清除

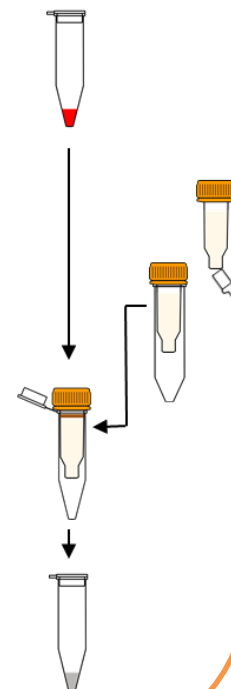
- 将血样添加到反应容器中, 并按说明添加 **ELB**
- 通过涡旋震荡混合, 并在室温下孵育3分钟
- 以2000 x g*的速度离心白细胞1分钟, 然后完全除去上清液
- 将55 μl **LB** +25 μl **P** 添加到白细胞颗粒中, 涡旋震荡混合
- 在60°C温度下最大振荡孵育5分钟

柱制备 (60°C培养期间)

- 通过涡旋震荡使柱状树脂均匀化并放置在2ml试管, 静置约10分钟
- 在盖子上打孔, 打开立柱1/2圈并折断底部封盖
- 将色谱柱放回2ml试管中
- 以1000 x g*离心1分钟, 以洗脱柱缓冲液
- 将色谱柱置于1.5 ml试管中并添加样品

DNA的纯化

- 添加 10 μl **CS** 然后快速涡旋震荡
- 通过上下移液10次使样品均匀化
- 全速离心2分钟
- 通过盖孔缓慢移液转移裂解上清液-参见操作流程1
- 以1000 x g离心1分钟*
- 纯化的DNA可以随时使用。



2020/06/9



北京中生柏奥生物科技有限公司

BioEcho Life Sciences GmbH

手机: 18610438010/18911671291

电话: 400-188-6323

网站: www.bioecho.cn

