

EchoLUTION血液DNA微量试剂盒说明书

用于从液体血液样本中一步纯化基因组DNA

本操作流程适用于纯化高达60µl（新鲜、抗凝或冷冻）的人或动物全血（EDTA-、柠檬酸盐-或肝素抗凝）或白细胞层。该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

- 每个样本60µl液体血液
- 带转子的微型离心机，适配于1.5和2ml反应管
- 恒温混匀仪，能够加热至60°C和80°C。或者：加热块或加热室
- 注意事项：将离心机切换到相对离心力 r_{cf} ($x g^*$)；如果不是这样的话可能的话，请使用下面的公式
- 涡旋震荡器
- 10µl和200µl的移液管，相应的移液管枪头
- 每个样品备一个反应管（1.5 ml），用于裂解步骤（最好是安全锁）
- 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
- 快速开盖小工具（操作流程1）：穿帽器（BioEcho产品编号050-001-001）

实验前的准备

- 将恒温混匀仪或热块加热至60°C
- 将微型离心机设置为1000 $x g^*$
- 注意事项：切换至相对离心力， r_{cf} ($x g^*$ ，而非rpm)

操作流程1：使用穿帽器进行净化

色谱柱盖包含可防止任何样品污染的再密封阀打孔后穿过盖子。在样品装载过程中，确保穿孔带有吸管尖端的阀门；轻微的压力释放表明了这一点。

裂解

1. 分别将60µl的血液样品、50µl血液裂解缓冲液 **LB** 和10µl TurboLyse B蛋白酶混合物 **P** 加至至1.5 ml反应管（最好带安全帽）。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%)	Yours
LB 血液裂解液 (µl)	50	330	660	
P TurboLyse B 蛋白酶混合物 (µl)	10	70	130	
Final volume (µl)	60	400	790	

向每个60µl血液样本中加60µl裂解主要混合物，涡旋震荡。

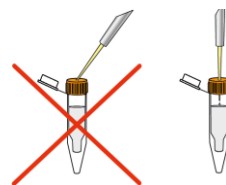
2. 将反应管置于恒温混匀仪中，并在60°C下以最大的震荡孵育30分钟。裂解时间可缩短至15分钟，且PCR无损失但A260/A230纯度比可能会降低。同时在裂解过程中，进行“柱制备”步骤5
3. 在60°C下孵育后，将温度升高至80°C并孵育10分钟最多震荡10分钟。

柱制备（步骤2和3期间）

4. 短暂涡旋震荡EchoLUTION色谱柱，并将其放入2ml反应管中。静置10-20分钟。
5. 使用穿帽器（扫描二维码观看视频）：在立柱盖子上打孔，并将柱连同穿帽器一起从2ml收集管中取出。掰断立柱的底部封盖，并通过顺时针旋转扭转分离穿帽器。将穿孔的色谱柱放回2ml反应管中。
6. 以1000 $x g^*$ 离心1分钟。丢弃收集于2ml反应管中的缓冲液。
7. 将制备好的EchoLUTION色谱柱放入新的1.5 ml反应管中用于洗脱提取纯化，并放回支架中。继续“DNA纯化”。

DNA的纯化

8. 执行步骤3后，向每个样品中加10µl的洗涤溶液 **CS**，并涡旋震荡3秒。样品会变得混浊。
注：由于内源性核糖核酸酶，通常不需要加核糖核酸酶。如果RNA需要严格降解，加洗涤溶液前加1ulRNA酶溶液并在室温下孵育2分钟。如果从白细胞层中提取，需使用移液器上下吹打10次后再继续离心（步骤10）。
9. 以最大速度离心2分钟。
10. 将含有DNA的裂解上清液（最大100µl）转移到步骤7中制备的EchoLUTION色谱柱，如图所示：



将移液器枪头尖端通过开孔的管盖（轻微释放压力；否则，重新使用吸管头）上垂直插入纯化管内并缓慢地（5秒）把样品加到色谱柱中。

Note:

- 可多次加载剩余上清液，且不会干扰纯化。

11. 以1000 $x g^*$ 离心1分钟。纯化的DNA（50-80µl，供体特异性）通过色谱柱进入1.5 ml洗脱管，丢弃色谱柱。洗脱后的DNA可立即使用或保存在2-8°C或长期储存在-20°C。若用于分光光度分析，可使用随试剂盒提供的1x Tris缓冲液作 **T** 为空白对照。

操作流程2: 无需穿帽器的纯化

裂解

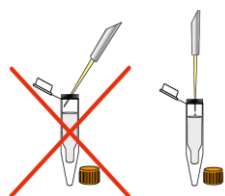
1. 执行操作流程1中的步骤1-3。

柱制备

4. 短暂涡旋震荡EchoLUTION色谱柱, 并将其放入2ml反应管中。让静置10-20分钟
5. 将色谱柱的螺帽拧松半圈, 然后掰下底部封盖。
注意事项: 不要重新拧紧色谱柱的螺帽。螺帽必须保持松开半圈不动以避免产生真空。将色谱柱放回2 ml反应管中, 并将装有色谱柱的反应管放回离心机中。
6. 以1000 x g*离心1分钟。丢弃含有反应物的2ml反应管。
7. 将制备好的色谱柱放入一个新的1.5 ml反应管中, 用于洗脱溶液采集DNA样本, 并放回支架中。继续“DNA纯化”。

DNA的纯化

8. 执行步骤3后, 向每个样品中加10µl的洗涤溶液 (CS)。涡旋震荡3秒混合。样品会变得混浊。
注: 由于内源性核糖核酸酶, 通常不需要加核糖核酸酶。如果RNA需要严格降解, 加清除剂前加1µlRNA酶溶液并在室温下孵育2分钟。
9. 以最大速度离心2分钟。
10. 将含有DNA的上清液 (最大100µl) 转移到制备的柱上从步骤7开始, 如图所示:



打开色谱柱管盖, 用移液器缓慢 (5秒) 将上清液加到准备好的色谱柱的树脂层中心上方。加完样后, 关闭螺帽并再次拧松半圈。
重要事项: 不要重新拧紧色谱柱螺帽柱。

Note:

- 在加载裂解液上清液期间, 不要用移液器枪头尖端接触树脂层!
 - 可多次加载剩余上清液, 且不会干扰纯化。
11. 在1000 x g*下离心1分钟。纯化的DNA洗脱到1.5 ml洗脱管中, 然后可立即应用于下游实验。

产品使用限制

TEchoLUTION血液DNA微量试剂盒仅供研究使用。目前没有注册或注册被授权用于诊断、预防或治疗疾病。

*来计算每分钟的轮数转换 (rpm) 输入循环数。

*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: $rpm = 1,000 \times \sqrt{r \times g}$, 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。

用于从液体血液样本中一步纯化基因组DNA

产品编号 (rxn)	010-001-010 (10)	010-001-050 (50)	010-001-250 (250)
------------	------------------	------------------	-------------------

试剂盒内容物

血液裂解缓冲液, TurboLyse B&C蛋白酶, 洗涤溶液、1x Tris缓冲液、色谱柱

快速操作流程 (请先阅读操作流程)

裂解

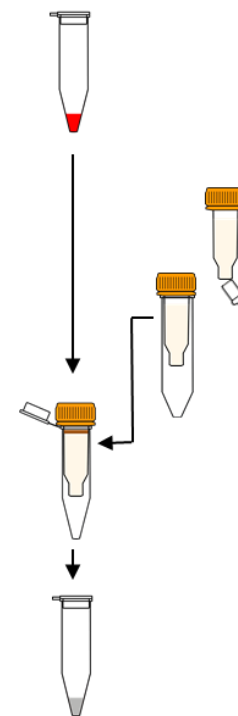
- 将50 µl (LB) + 10 µl (P) 转移到反应管中
- 加入60µl血液, 快速震荡
- 在60°C条件下以最大震荡速度孵育30分钟
- 在80°C下以最大震荡速度孵育10分钟,
- 加10 µl (CS) 然后快速震荡
- 以最大速度离心2分钟

柱制备 (在60°C和80°C孵育期间)

- 涡旋震荡色谱柱, 置于2ml试管中静置10分钟
- 用穿帽器在盖上打孔, 以及取下底部封闭物
- 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

DNA的纯化

- 通过盖孔缓慢移液转移裂解液上清液 (最大100µl)
- 以1000 x g*离心1分钟, 将DNA洗脱到洗脱管中
- 洗脱DNA即可使用



2020/01/23



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

