

EchoLUTION血液DNA试剂盒-干血斑说明书

用于从干血斑中一步纯化基因组DNA，本操作流程针对1至5个打孔的干血斑 (~3mm) 制定。

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

- 每个样本使用1到5个打孔的干血斑 (~3 mm)。
- 带转子的微型离心机，适配于1.5和2ml反应管。
注意事项: S切换到相对离心力, rcf (x g*)；如果不可能, 请使用以下公式*用于计算rpm到rcf的转换。
- 性能最快: 恒温混匀仪, 能够通过震荡加热至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 ml), 用于裂解步骤 (最好带安全锁)。
- 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。
- 10µl和200µl的移液器, 相应的移液器枪头。
- 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. 分别将60µl的血液样品、100µl血液裂解缓冲液和10µl TurboLyse B&C蛋白酶混合到1.5ml反应管中, 最好带安全锁。如果使用两个以上的样品, 准备预混合, 最终体积比所需体积要大10% (见表)。

表: 预混计算及示例 (见盖标签)

样品数量	1	6 (+10%)	12 (+10%)	自己的
TurboLyse B&C蛋白酶(ul)	10	66	730	132
血液裂解缓冲液(ul)	100	660	330	1320
最终体积 (ul)	110	726	1060	1452

2. 添加1到5个打孔的干血斑 (~3 mm)。涡旋震荡。

3. 将试管置于恒温混匀仪中, 并在60°C温度下孵育30分钟, 并在60°C温度下全速震荡。或者, 在加热块上孵育60分钟, 然后进行涡旋震荡裂解过程中3次。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, 继续进行“柱制备”步骤5 (如下)。
4. 将温度升高至80°C并再孵育10分钟。

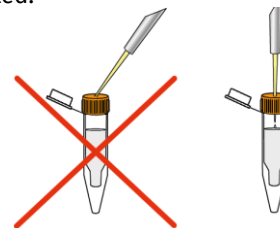
柱制备

5. 短暂涡旋震荡EchoLUTION色谱柱, 并将其放入2ml反应管中。静置5-10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盖冲孔器。将穿孔的色谱柱放回2ml反应管中。
7. 以1000 x g*离心1分钟。丢弃收集于2ml反应管中的缓冲液。
8. 将制备好的EchoLUTION色谱柱放入一个新的1.5 ml反应管中, 放回支架准备下一步分离洗脱样本DNA。
继续“DNA纯化”。

纯化

9. 执行步骤4后, 向每个样品中添加10µl的洗涤溶液, 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, 通常不需要添加核糖核酸酶。如果RNA需要严格降解时, 在添加洗涤剂之前添加1:1 RNase A溶液并在室温下孵育2分钟
10. 以最大速度离心2分钟。
11. 将含有DNA的上清液从步骤8转移到制备的柱上, 如图所示说明:

illustrated:



将移液器枪头尖端通过开孔的管盖上垂直插入纯化管内并缓慢地 (5秒) 把样品加到色谱柱中。

12. 在1000 x g*下离心1分钟。纯化的DNA (50-80µl, 献血者特异) 流动通过色谱柱进入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4°C下长期储存-20°C。对于分光光度分析, 把试剂盒随附的10x Tris缓冲液按1:10稀释后成为1x Tris缓冲液再作为空白对照。

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1-4。

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, 然后扣下底部封盖。

注意事项: 不要关闭色谱柱的螺帽。螺帽必须保持松开半圈不动以避免产生真空。将该柱放回原位2 ml收集管, 并将含有色谱柱的收集管两者都放入离心机。

7. 以1000 x g*离心1分钟。丢弃装有色谱柱的2ml反应管缓冲器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。

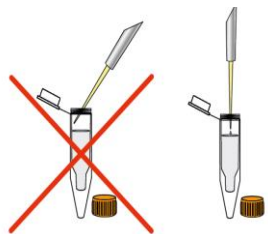
继续“纯化”(下文)

纯化

9. 执行步骤4后, 向每个样品中添加10μl的洗涤溶液。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, 通常不需要添加核糖核酸酶。如果RNA需要严格降解时, 在添加清除剂之前添加1ul RNase A溶液并在室温下孵育2分钟

10. 以最大速度离心2分钟。

11. 将含有DNA的上清液从步骤8转移到制备的柱上, 如图所示说明:



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。

12. 在1000 x g*下离心1分钟。纯化的基因组DNA (50-80μl, 献血者特异性) 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试剂盒仅供研究使用。目前未经注册或授权用于诊断、预防或治疗疾病

*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: $rpm = 1,000 \times r$, 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。

用于从干血斑中一步纯化基因组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, 清除溶液, 10倍Tris缓冲液, 色谱柱		

快速操作流程1

裂解和样品清除

- 将100μl μl (BL) + 10 μl (TLP) 转移到反应管中, 短暂涡旋震荡。
- 加入1至5个打孔的干血斑, 短暂涡旋。
- 在60°C条件下, 最大震荡30分钟。
- 在80°C条件下, 以最大震荡速度孵育10分钟。

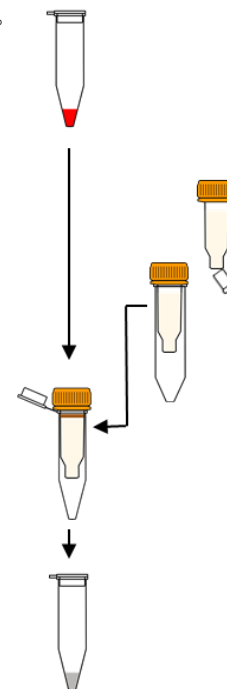
柱制备 (在60°C和80°C孵育期间)

- 通过涡旋震荡使柱状树脂均匀化并放置在2ml试管, 静置5分钟。
- 在瓶盖上打个洞, 然后把瓶盖的底部打开 (扫描二维码观看视频)。
- 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10μl (CS) 然后快速涡旋震荡。
- 离心机。全速离心2分钟。
- 通过盖孔缓慢转移裂解物- 参见操作流程1或观看视频 (扫描二维码)。
- 在1000 x g*下离心1分钟。

纯化的DNA可以随时使用



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

