

Protocol: Isolation of Genomic DNA from Small Volumes of Blood (CAT#56304)

这个操作步骤用于从 1~100ul 经 EDTA，柠檬酸或肝素等抗凝处理过的全血中纯化 DNA

开始之前须知：

离心步骤都在室温(15–25°C)下进行。

注意：

- 室温(15–25°C)平衡样品
- Buffer AE 或者蒸馏水都在室温(15–25°C)下平衡用于洗脱
- 将加热仪器或者孵箱温度设置到 56 度，用于步骤 5
- 保证 Buffer AW1 和 AW2 已经按照 14 页的说明准备好了。
- 如果 Buffer AL 或者 Buffer ATL 有沉淀，70 度加热，轻摇即可溶解
- 可选：如果处理样品量比较少（小于 10ul），可以将 carrier RNA 溶解在 Buffer AE 中，再加入 Buffer AL 中，按照第 15 页的说明。

操作步骤：

1、将 1~100ul 全血加入到 1.5ml 的离心管中。

2、加入 Buffer ATL，使得终体积为 100ul。

3、加入 10ul 的蛋白酶 K。

4、加入 100ul 的 Buffer AL，盖好管盖，涡旋 15s。

为了保证有效地裂解，一定要将样品、Buffer ATL、蛋白酶 K、Buffer AL 充分混匀。如果血液的体积少于 10ul，我们建议在 Buffer AL 中加入 carrier RNA，但是应该先将 carrier RNA 溶解在 Buffer AE 中，再加入 Buffer AL 里。

将 Buffer AL 加入到 Buffer ATL 中会形成白色沉淀，但并不会影响 QIAamp 的过程，因为在第 5 步的加热时就会溶解。

5、56 度孵育 10min。

如果可以在孵育过程中可以摇晃一下样品，DNA 的产量可以增加。

6、短离 1.5ml 的离心管，收集管壁和管盖上残留的液体。

7、加入 50ul 的乙醇（96%~100%），盖好管盖，涡旋 15s，室温孵育 3min。

如果室温超过了 25 度，可以先将乙醇冰上降温。

8、短离 1.5ml 的离心管，收集管壁和管盖上残留的液体。

9、将步骤 8 中的全部裂解液转移到 QIAamp MinElute 柱子上（在 2ml 的收集管中），不要弄湿管子边缘。盖好管盖，6000g（8000rpm）离心 1min，将 QIAamp MinElute 柱子放在一个干净的 2ml 的收集管中，丢弃含有流出液的收集管。

如果裂解液在离心之后没有完全通过膜，再次高速离心，直到 QIAamp MinElute 柱子上的液体全部流干。

10、小心打开 QIAamp MinElute 柱子的管盖，加入 500ul 的 Buffer AW1，不要弄湿管壁和管盖。盖上管盖，6000g（8000rpm）离心 1min，将 QIAamp MinElute 柱子放在一个干净的 2ml 的收集管中，丢弃含有流出液的收集管。

操作过程中不要触碰到 QIAamp MinElute 柱子和流出液。一些离心机的转子在减速过程中会发生振动，导致含有乙醇的流出液碰到 QIAamp MinElute 柱子。所以在取出柱子时要格外小心。

12、全速(20,000 x g; 14,000 rpm)离心 3min，可以使膜完全干燥。

这一步很有必要，因为如果将乙醇带入到洗脱液中，可能会干扰到下游的应用。

13、将 QIAamp MinElute column 置于一个干净的 1.5ml 的离心管中，丢弃含有流出液的收集管。小心地打开 QIAamp MinElute column，加入 20~100ul 的 Buffer AE 或者蒸馏水到膜的中间。

如果 PH 或者 EDTA 比较高，会影响下游的敏感应用，在第 12 步用水洗脱。

注：保证 Buffer AE 或者蒸馏水已经平衡至室温 (15–25°C) 了。如果洗脱体积小于 50ul，可以再加一次 Buffer AE 或者蒸馏水到膜的中间，以保证所有 DNA 能全部洗脱。

我们提供的柱子规格比较灵活，可以根据需要选择。但洗脱液的体积最多会比洗脱之前少 5ul。

14、盖好管盖，室温(15–25°C)孵育 1min，全速（20000g/14000rpm）离心 1min。

在离心之前，用 Buffer AE 或者水，室温孵育柱子 5min，可以增加 DNA 的产量。