# 血液基因组提取

### 1 实验目的

提取样品DNA

### 2 适用范围

该方法适用于哺乳动物血液DNA提取

### 3 实验原理

红细胞裂解液裂解红细胞，离心后收集白细胞，裂解白细胞后沉淀蛋白，收集DNA。

### 4 实验仪器

高速离心机、水浴锅、振荡器

### 5 试剂耗材

红细胞裂解液配方 10乘

试剂 终浓度 加入量

0.5M EDTA 10mM 40ml

NaHCO3 10mM 1.68g

NH4Cl 1.44M 154.08g

ddH2O 补足2L

核裂解液：

配制规模：2000ml

试剂名称 终浓度 用量

1M Tris-HCl(pH8.0) 10 mM 20 ml

0.5M EDTA 2 mM 8 ml

5M NaCl 100 mM 40 ml

10% SDS 1% 200 ml

注意：SDS最后加避免出现大量泡沫，定容时注意泡沫，等泡沫消了后再定容。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂耗材 | 用量 |
| 红细胞裂解液 | 3ml |
| 细胞核裂解液 | 1ml |
| RNase A | 约3μl |
| 5M NaCl | 350μl |
| 75%乙醇 | 2ml |
| 1.5mlEP管 | 4个 |
| 15ml离心管 | 4个 |

### 6 操作步骤

取血液300μl ，加入600μl红细胞裂解液至1.5ml离心管中，室温放置10分钟，期间可来回颠倒6-8次，确保充分混匀。

1. 2000Xg离心10分钟，弃除红色上清，留下完整的管底白色细胞团和残余300-500**μ**l上清。
2. 离心后在管底见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，但是如果看到的是大部分的红色细胞团，说明红细胞裂解很不充分，应该将1、2步再重复一次
3. 漩涡震荡15S，重悬、充分分散白细胞团。（细胞的重悬分散对下一步裂解非常重要）
4. 在白细胞团沉淀中加入600l细胞核裂解液。
5. 改用大口径枪头迅速有力吹打，由于基因组DNA立刻释放出来，混合物会马上变得十分粘稠。继续轻柔吹打或者颠倒混匀，如果还有肉眼可见团块，可在65℃温育30-60分钟（不要超过一小时）至裂解完全。
6. 在裂解物种加入RNase A（10mg/ml）至终浓度为30μg/ml，颠倒混匀，37℃温育15分钟去除残留RNA，然后冷却回室温。
7. 加入350μl蛋白沉淀液（5M NaCl）漩涡震荡25S，见到一些小的白色团块，-20 ℃ 5 min，12500离心10min，吸取上清到一个新的管子中。
8. 重复步骤8，直到没有沉淀为止。
9. 12500 rpm空离5 min，将上清转移到新管中。
10. 加入2/3体积的预冷的异丙醇，轻柔颠倒30次，直到看到絮状沉淀，-20℃冷冻30min。
11. 13000rmp离心10min，弃上清。
12. 1ml的75%乙醇洗涤2次。

弃除75%乙醇，用枪头吸去残液，晾干，用TE溶解