

## AmPure Blood DNA Kit

(快速从各种抗凝血液样品中制备 DNA 用于 PCR)

### 简介

Magen 公司的 AmPure 产品系列采用独特的溶液系统，可快速地从各种生物样品中快速制备 DNA，用于 PCR。该系统只需对样品进行简单的处理，无需抽提纯化，得到的裂解液可直接用于各种 PCR，对 Taq 酶和反应液无特别要求。AmPure Blood DNA Kit 含快速制备 DNA 的溶液，适合于从人类、哺乳类的抗凝的血液样品中制备 DNA，也适合于从鸟类、爬行类、两栖类、鱼类等抗凝血液制备 DNA，得到 DNA 粗制液可直接用于 PCR 反应。

AmPure Blood DNA Plus Kit 含有快速制备 DNA 的溶液和 2 x Taq MasterMix (含溴酚蓝)。Taq MasterMix 含有甘油和溴酚蓝，可直接上样。

### 组成

#### AmPure Blood DNA Kit

产品成分	D7105-01	D7105-02	D7105-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
Buffer LB1	30 ml	150 ml	300 ml
Buffer AD	12 ml	60 ml	110 ml

#### AmPure Blood DNA Plus Kit

产品成分	D7106-01	D7106-02	D7106-03
制备次数	100 次	500 次	1000 次
Buffer LB1	30 ml	150 ml	300 ml
Buffer AD	12 ml	60 ml	110 ml
制备次数	100 次	500 次	1000 次
Taq MasterMix	2 x 1ml	8 x 1ml	14 x 1ml
dH2O	10 ml	2 x 20 ml	3 x 40ml

### 保存条件

试剂盒可保存 2-8°C。Taq MasterMix 建议分装保存于-20°C。Proteinase K 溶解后，保存于-20°C。反复冻融 Proteinase K 和 Taq MasterMix 会影响实验结果。

### 准备条件

- 灭菌的离心管
- 95°C 水浴锅
- 55°C 水浴锅
- 加入适量 Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉，使其终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡溶解，分装保存于-20°C

### Section A. DNA 制备步骤

#### ● 全血 DNA 处理

1. 吸取 250µl Buffer LB1 至 1.5ml 离心管中，然后加入 100µl 抗凝血液，颠倒混匀 3~5 次。
2. 10,000 x g 离心 1 分钟收集细胞核。小心倒弃上清液。
3. 加入 100µl Buffer AD 至沉淀中，涡旋混匀 10 秒。
4. 室温放置 5~15 分钟。
5. 把样品保存于室温或取 1-3µl 粗提液用于 PCR。

#### ● 血卡 DNA 处理

1. 用打孔器从干血片中切出 1~3 片直径为 3mm 的带血圆片，并转移至 2.0ml 离心管中。
2. 取 500µl 灭菌水至样品中，涡旋混匀 10 秒，静置 2 分钟，吸弃溶液。
3. 加入 100µl Buffer AD 至沉淀中，80 度放置 10 分钟。
4. 把样品保存于室温或取 1-3µl 粗提液用于 PCR。

## Section B. PCR 扩增

1. 按下表在冰上配制 PCR 反应液:

试剂	体积
灭菌水	~ $\mu$ l
2 x Taq MasterMix	12.5 $\mu$ l
上游引物	~ $\mu$ l
下游引物	~ $\mu$ l
DNA 抽提液	1~3 $\mu$ l
总体积	25 $\mu$ l

2. 混匀;

3. 按下表设定 PCR 仪的程序:

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94°C	3 分钟	1
变性	94°C	0.5-1 分钟	30-35
退火	45-68°C	0.5-1 分钟	循环
延伸	72°C	1-2 分钟	
最后延伸	72°C	10 分钟	1
保存	4°C	For ever	

4. 当 PCR 预热上 94°C 时, 暂停 PCR 仪, 把样品放入 PCR 仪中, 立即进行扩增。

5. 反应结束后, 取 3-5 $\mu$ l PCR 产物上样于 1.5-2% 琼脂糖凝胶上电泳分析结果。

## C. 常见问题回答

### ● 扩增条带很弱或没有?

1. 样品中含有大量的抑制因子: 用灭菌水稀释 DNA。若需检测是否由抑制因子, 可 DNA 粗制液加入 100-500 个拷贝的已知的基因模块, 再进行 PCR。
2. PCR 参数设计不够合理; 改变退火温度, 延伸时间, 延长循环数等;
3. 加入 Buffer R3 后, 细胞核沉淀团没有充分涡旋打散, DNA 没有充分释放出来。
4. 样品在贮藏过程中发生降解。

### ● 扩增条带不特异?

1. 采用热启动 Taq 酶, 以提高特异性;
2. 若使用 Taq MasterMix, 必须在冰上配制反应液, 并待 PCR 仪升温至 94°C 后, 再把 PCR 反应液转移至 PCR 仪中, 以减少非特异性的扩增。
3. 用 Touchdown PCR 技术, 减少非特异性的扩增。