

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库					
质量管理体系文件					
文件名称	新鲜和冰冻血液 DNA 提取操作规程			编号	SOP-SC-052-01
批准人		批准日期		实施日期	

新鲜和冰冻血液 DNA 提取操作规程

1. 目的

规定从新鲜和冰冻血液中提取 DNA 实验应遵守的操作。

2. 适用范围

使用与从新鲜和冰冻血液中提取 DNA 的操作。

3. 定义和术语

3.1 DNA Deoxyribonucleic Acid

即脱氧核糖核苷酸, 是遗传信息储存及传递者。

4. 职责

4.1 样本库实验技术员负责从新鲜和冰冻血液中提取DNA。

5. 设备和器材

见正文内容

6. 正文

6.1 试剂准备

6.1.1 所需试剂:

氯仿、EDTA、无水乙醇、70%乙醇、苯酚、1xPBS、蛋白酶 K、TE 缓冲液。

6.1.2 Tris-EDTA

1M Tris, pH 8.0, 20ml

0.5M EDTA, 20ml

无菌水

6.1.3 蛋白酶 K (20mg/ml)

将 200mg 蛋白酶 K 加入到 10ml TE 缓冲液, 室温下放置 20 分钟。分装后-20

℃贮存。

6.2 新鲜血样中收集血细胞

6.2.1 将收集的新鲜血液置于含有 EDTA 的小管中。

6.2.2 将血样转移至离心管并于 4℃ 下 1300g 离心 15 分钟。

6.2.3 吸去上清，用移液管将淡黄色层小心转移至新管中并再次离心，弃去红细胞沉淀。

6.2.4 将淡黄色层重悬于 15ml 裂解缓冲液中，并于 37℃ 温育 1 小时，然后进行 DNA 提取。

6.3 冰冻血样中收集血细胞

6.3.1 将收集的新鲜血液置于含有 EDTA 的小管中。

6.3.2 室温水浴中解冻血样并转移至离心管，加入等体积磷酸盐缓冲液。

6.3.3 在室温下 3500g 离心 15 分钟。

6.3.4 吸去含有裂解红细胞的上清，将沉淀重悬于 15ml 裂解缓冲液，并于 37℃ 温育 1 小时，然后进行 DNA 提取。

6.4 DNA 提取（酚-氯仿法）

6.4.1 将裂解液移至一个或多个适合离心机的离心管中，裂解液不能超过 1/3 体积。

6.4.2 加入蛋白酶（20mg/ml）至终浓度 100ug/ml。用玻棒温和将酶混入裂解液中。

6.4.3 将裂解液置于 50℃ 水浴中 3 小时，不时旋转溶液。

6.4.4 将溶液冷却至室温，加入等体积的 0.1M Tris.Cl (pH8.0) 平衡过的苯酚。将离心管缓慢颠转 10 分钟温和地混合两相。将离心管置于旋转器上 1 小时。

6.4.5 室温下 5000g 离心 15 分钟分离两相。

6.4.6 将黏滞的水相（上层）转移至另一离心管。

6.4.7 用苯酚在抽提两次，收集水相。

6.5 DNA 分离

6.5.1 第三次苯酚抽提后，将水相转移至另一离心管中。加入 0.2 倍体积 10M 醋酸氨及 2 倍体积乙醇，旋转离心管直至溶液彻底混匀。

6.5.2 DNA 随即形成沉淀，在室温 5000g 离心 5 分钟收集沉淀。

6.5.3 用 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次，在室温 5000g 离心 5 分钟收集沉淀。

6.5.4 尽可能使用真空泵吸去残余的乙醇。于室温将 DNA 沉淀置于敞开的管内，直至可见的痕量乙醇挥发殆尽。

6.5.5 加入 TE 缓冲液，将其置于摇床上，于 4℃温和振摇 12-24 小时直至 DNA 完全溶解。

6.5.6 将 DNA 溶液储存于 4℃。

7. 相关文件

《核酸提取和纯化控制程序》 SOP-SC-030-01

8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6