



FlexGen Blood DNA Kit (0.1–20 mL)

血液基因组非柱式提取试剂盒 (0.1–20 mL)

Cat. No. CW0544

产品简介

本试剂盒提供了一种快速、灵活的方法，适用于提取新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的样品）总DNA，包括基因组DNA和线粒体DNA。本品可以灵活处理0.1–20mL的全血，采用非离心柱的方法，无需使用苯酚、氯仿等有机溶剂，有效去除蛋白、色素、脂类及其它抑制性杂质污染。整个过程在一个管中操作，减少了污染及样本混淆的风险。提取的DNA产量高、质量好，可直接用于PCR、荧光定量PCR、酶切和Southern Blot以及文库构建等实验。

保存条件

Buffer FG1 2–8℃，其他组分室温（15–30℃）。

产品内容

Component	CW0544S 可处理50 mL血液	CW0544M 可处理200 mL血液
Buffer FG1	2×65 mL	2×260 mL
Buffer FG2	30 mL	120 mL
Buffer GE	15 mL	60 mL
Proteinase K	3 mg	12.5 mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25 mL	1.25 mL

产品特点

- 纯度高: 提取的基因组DNA可直接用于下游PCR、荧光定量PCR、酶切等各种实验。
- 提取量大: 可从0.1-20 mL的全血中提取DNA, 无需使用苯酚、氯仿等有机溶剂。
- 兼容性强: 适用于处理各种血液和细胞样本。

自备试剂：异丙醇、70%乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入指定用量的Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。

Cat. No.	CW0544S	CW0544M
Proteinase K Storage Buffer	0.3 mL	1.25 mL

2. 所有离心操作均在室温下完成。
3. 血液样品反复冻融，会导致提取的DNA片段较小且提取量下降。所得基因组DNA也应尽可能避免反复冻融，以免降解。如果提取冷冻血液的基因组DNA，建议37℃水浴，迅速解冻后再进行后续操作。
4. 血液样品的储存：
 - 1) 短期保存：已加入抗凝剂的血液样品可在2-8℃储存最多10天，对于某些实验例如Southern杂交等，需要得到完整全长的基因组DNA，请将血液样品在2-8℃储存不超过3天，此时基因组DNA的降解程度较轻。
 - 2) 长期保存：已加入抗凝剂的血液请置于-70℃保存（如果提取的是高分子量的DNA，推荐使用EDTA作为抗凝剂）。

操作步骤

一、从100–900 μL 全血中提取基因组（以300 μL 血液处理为例）

1. 取300 μL 全血于2 mL离心管（自备）中，加入300 μL （样本等体积）Buffer FG1，上下颠倒混匀5次，10,000 $\times$ g离心30秒，弃上清。
2. 再向离心管中加入450 μL （1.5倍样本体积）Buffer FG1，涡旋震荡，使沉淀完全分散。10,000 g离心30秒，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上，放置2分钟。
注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。将离心管倒置在吸水纸上，可以减少管壁上清的回流。
3. 按照附表配制Buffer FG2与Proteinase K的混合液（比例100:1）。
注意：此混合液最好现用现配，并在配好后1小时之内用完。
4. 加入150 μL Buffer FG2与Proteinase K的混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。
注意：1) 如果有多个样品同时操作，加入Buffer FG2/Proteinase K混合液后立即涡旋震荡，不要等所有样品都加完后再震荡。
2) 通常涡旋震荡3–4次，每次5秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入30 μL Buffer FG2/Proteinase K混合液，再次涡旋混匀。
5. 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。
注意：如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。
6. 加入150 μL 异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至出现丝状或簇状基因组DNA。
注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要。如果样品中白细胞含量少，可能看不到DNA，则至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。
7. 10,000 $\times$ g离心5分钟。
注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。
8. 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。
注意：少数时候沉淀可能贴壁不牢，注意不要吸弃沉淀。
9. 加入300 μL 70%乙醇，涡旋震荡5秒，10,000 $\times$ g离心5分钟，弃上清。
注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。
10. 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。
注意：在管底可见白色的DNA沉淀，在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（没切、PCR等）实验，但避免过度干燥DNA沉淀，因过度干燥会使DNA难于溶解。

12. 加入200 μ L Buffer GE，低速涡旋5秒，65℃孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。-20℃保存DNA。

注意：如果DNA没有完全溶解，可室温过夜。

二、从1-5 mL全血中提取基因组（以3 mL血液处理量为例）

1. 取3 mL全血于15 mL离心管（自备）中，加入3 mL（样本等体积）Buffer FG1，上下颠倒混匀5次，2,500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

2. 再向离心管中加入4.5 mL（1.5倍样本体积）Buffer FG1，涡旋震荡，使沉淀完全分散。2,500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上，放置2分钟。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。将离心管倒置在吸水纸上，可以减少管壁上清的回流。

3. 按照附表配制缓冲液FG2与Proteinase K的混合液（比例100:1）。

注意：此混合液最好现配现用，并在配好后1 h之内用完。

4. 加入1.5 mL Buffer FG2/Proteinase K混合液，立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意：1) 如果有多个样品同时操作，加入Buffer FG2/Proteinase K混合液后立即涡旋震荡，不要等所有样品都加完后再震荡。

2) 通常涡旋震荡3-4次，每次5秒可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入300 μ L BufferFG2/Proteinase K混合液，再次涡旋混匀。

5. 65℃孵育10-30分钟，其间颠倒混匀数次。

注意：如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。

6. 加入1.5 mL异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至看到DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要。如果样品中白细胞含量少，可能看不到DNA，则至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。

7. 2,500 $\times$ g离心5分钟。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

8. 弃上清, 并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

注意: 在管底可见白色的DNA沉淀, 在极少情况下沉淀可能会松弛, 所以要缓慢倒掉上清。

9. 加入1.5 mL 70%乙醇, 涡旋震荡5秒, 2,500×g离心5分钟, 弃上清。

注意: 如果沉淀贴壁不牢, 可以适当延长离心时间或增大离心力。

10. 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟, 确保沉淀在管中。

注意: 在极少情况下沉淀可能会松弛, 所以要缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净 (至少5分钟)。

注意: 乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR等) 实验, 但避免过度干燥DNA沉淀, 因过度干燥会使DNA难于溶解。

12. 加入300 μ L Buffer GE, 低速涡旋5秒, 65℃孵育1小时溶解DNA, 期间轻弹数次助溶。-20℃保存DNA。

注意: 如果DNA没有完全溶解, 可室温过夜。

三、从6-20 mL全血中提取基因组 (以10 mL血液处理量为例)

1. 取10 mL全血于50 mL离心管 (自备) 中, 加入10 mL Buffer FG1, 上下颠倒混匀5次, 2,500×g离心5分钟, 弃上清。

2. 再向离心管中加入15mL Buffer FG1, 涡旋震荡, 使沉淀完全分散。2,500×g离心5分钟, 弃上清, 并把离心管倒置于干净的吸水纸上, 放置2分钟。

注意: 在极少情况下沉淀可能会松弛, 所以要缓慢倒掉上清。

3. 按照附表配制缓冲液FG2与Proteinase K的混合液 (比例100:1)。

注意: 此混合液最好现配现用, 并在配好后1h之内用完。

4. 加入5 mL Buffer FG2/Proteinase K混合液, 立即涡旋混匀至溶液无团块。

注意: 1) 如果有多个样品同时操作, 加入Buffer FG2/Proteinase K混合液后立即涡旋震荡, 不要等所有样品都加完后再震荡。

2) 通常涡旋震荡3-4次, 每次5秒可以使沉淀充分悬浮, 如果涡旋震荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入1mL Buffer FG2/Proteinase K混合液, 再次涡旋混匀。

5. 65℃孵育30分钟, 其间颠倒混匀数次。

注意: 如果样品颜色从红色变成橄榄绿说明蛋白消化完全。

6. 加入5 mL异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至看到DNA。

注意：与异丙醇完全混合对于沉淀DNA非常重要，应该至少上下颠倒离心管20次确保沉淀完全。

7. 2,500×g离心5分钟。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

8. 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

注意：在管底可见白色的DNA沉淀，在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

9. 加入5 mL 70%乙醇，涡旋震荡5秒，2,500×g离心5分钟，弃上清。

注意：如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

10. 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

注意：在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

注意：乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）式样，但避免过度干燥DNA沉淀，因过度干燥会使DNA难于溶解。

12. 加入1 mL Buffer GE，低速涡旋5秒，65℃孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。-20℃保存DNA。

注意：如果DNA没有完全溶解，可室温过夜。

附表：不同体积血液所需各种缓冲液用量

	血液样品的体积 (μL)									
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000			
Buffer FG1 (μL)	250	750	2500	7500	12500	25000	50000			
Buffer FG2 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000			
Proteinase K (μL)	0.5	1.5	5	15	25	50	100			
异丙醇 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000			
70%乙醇 (μL)	50	150	500	1500	2500	5000	10000			
Buffer GE (μL)	100	200	200	300	500	1000	1000			
补加FG2 和Proteinase K混合液	10	30	100	300	500	1000	1000			