

非柱式血液 DNA 提取试剂盒（0.1-20 ml）说明书

产品组成

Cat. No.	3005-A	3005-1	3005-2
蛋白酶 K 贮存液	50 μ l	0.3 ml	1.2 ml
Buffer FG	10 ml $\times$ 2	130 ml	260 ml $\times$ 2
Buffer AT	4 ml	30 ml	120 ml
Buffer TE	2 ml	15 ml	60 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存与有效期

蛋白酶 K 贮存液请置于 - 20℃ 储存，其他试剂于常温（0~30℃）储存，可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：电话：400-0099-857，QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn。

产品介绍

本试剂盒提供了一种快速、灵活的方法，适用于从不同体积的新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA 或肝素等抗凝剂处理过的样品）中提取总 DNA（包括基因组 DNA 和线粒体 DNA）。本品可以灵活处理 0.1-20 ml 的全血，采用非离心柱的方法，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 片段长（30~50 kb 为主）、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。

用户需自备的试剂与物品

1. 异丙醇和 70%乙醇
2. 2 ml 离心管、15 ml 离心管、50 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 离心机（可离心 2 ml 离心管或 15 ml 离心管或 50 ml 离心管）
5. 漩涡振荡器和水浴锅

使用前准备

1. 将水浴锅设置到 65℃。如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 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。
3. 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（肝素抗凝血样在 2-8℃ 储存可能会缓慢地产生血凝块，请直接将肝素抗凝血样冻存到 - 20℃ 或者 - 70℃），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：

附表：不同体积血液所需各种缓冲液的体积

	血液样本的体积 (μl)						
	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
Buffer FG (μl)	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
Buffer AT (μl)	50	150	500	1500	2500	5000	10000
蛋白酶K贮存液 (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 TE (μl)	100	200	200	300	500	1000	1000
补加Buffer AT和蛋白酶K贮存液混合液	10	30	100	300	500	1000	1000

一、从100–900 μl全血中提取基因组（以300 μl血液处理量为例）

1. 取300 μl全血于2 ml离心管中，加入300 μl（样本等体积）Buffer FG，上下颠倒混匀5次，10000×g离心30秒，弃上清，保留管底沉淀。
2. 向2 ml离心管中加入450 μl（1.5倍样本体积）Buffer FG，旋涡振荡，使沉淀完全分散。10000×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。

* 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 AT与蛋白酶K贮存液的混合液（比例100:1）。

* 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 AT/蛋白酶K贮存液的混合液，立即旋涡振荡混匀至溶液无团块。

* 如果有多个样品同时操作，加入Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液后立即旋涡振荡，不要等所有样品都加完后再振荡。

* 通常旋涡振荡3-4次，每次5秒，可以使沉淀充分悬浮，如果旋涡振荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入30 μl Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液，再次旋涡振荡混匀。

5. 65°C孵育10分钟，其间颠倒混匀数次。

* 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。

* 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. 10000×g离心5分钟，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 少数时候沉淀可能贴壁不牢，注意不要吸弃沉淀。

8. 加入300 μl 70%乙醇，旋涡振荡5秒，10000×g离心5分钟，弃上清。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 少数时候沉淀可能贴壁不牢，注意不要吸弃沉淀。

9. 低速离心数秒，用200 μ l移液器吸尽管底残留的70%乙醇，保留管底白色的DNA沉淀。

* 如果在离心管管口位置残留有血色素，请用纸巾吸干，以免混入溶解的DNA中影响DNA的纯度。

10. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

* 乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验，但应避免过度干燥DNA沉淀导致DNA难以溶解。

11. 加入100~200 μ l Buffer TE，低速旋涡5秒，65℃孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。-20℃保存DNA。

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离心管中，加入3 ml（样本等体积）Buffer FG，上下颠倒混匀5次，2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，保留管底沉淀。

2. 向离心管中加入4.5 ml（1.5倍样本体积）Buffer FG，旋涡振荡，使沉淀完全分散。2500 $\times$ 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。

* 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 AT与蛋白酶K贮存液的混合液（比例100:1）。

* 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1.5 ml Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液，立即旋涡振荡混匀至溶液无团块。

* 如果有多个样品同时操作，加入Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液后立即旋涡振荡，不要等所有样品都加完后再振荡。

* 通常旋涡振荡3-4次，每次5秒可以使沉淀充分悬浮，如果旋涡振荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入300 μ l Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液，再次旋涡振荡混匀。

5. 65℃孵育10-30分钟，其间颠倒混匀数次。

* 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出现丝状或簇状基因组DNA。

* 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. 2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 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，不要丢弃沉淀。

8. 加入1.5 ml 70%乙醇，旋涡振荡5秒，2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清，不要丢弃沉淀。

9. 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

* 如果在离心管管口位置残留有血色素，请用纸巾吸干，以免混入溶解的DNA中影响DNA的纯度。

10. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

* 乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验，但应避免过度干燥DNA沉淀导致DNA难以溶解。

11. 加入300~500 μ l Buffer TE，低速旋涡5秒，65°C孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。 - 20°C保存DNA。

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离心管中，加入10 ml（样本等体积）Buffer FG，上下颠倒混匀5次，2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，保留管底沉淀。

2. 向离心管中加入15 ml（1.5倍样本体积）Buffer FG，旋涡振荡，使沉淀完全分散。2500 $\times$ 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。

* 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 AT与蛋白酶K贮存液的混合液（比例100:1）。

* 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5 ml Buffer AT/蛋白酶K贮存液的混合液，立即旋涡振荡混匀至溶液无团块。

* 如果有多个样品同时操作，加入Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液后立即旋涡振荡，不要等所有样品都加完后再振荡。

* 通常旋涡振荡3-4次，每次5秒可以使沉淀充分悬浮，如果旋涡振荡后发现沉淀中含胶状物质可以再加入1 ml Buffer AT/蛋白酶K贮存液混合液，再次旋涡混匀。

5. 65°C孵育30分钟，其间颠倒混匀数次。

* 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。

* 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. 2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 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，不要丢弃沉淀。

8. 加入5 ml 70%乙醇，旋涡振荡5秒，2500 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

* 如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或增大离心力。

* 在极少情况下沉淀可能会松弛，所以要缓慢倒掉上清，不要丢弃沉淀。

9. 把离心管倒置于干净的吸水纸上5分钟，确保沉淀在管中。

* 如果在离心管管口位置残留有血色素，请用纸巾吸干，以免混入溶解的DNA中影响DNA的纯度。

10. 空气干燥DNA沉淀直至所有的液体挥发干净（至少5分钟）。

* 乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验，但应避免过度干燥DNA沉淀导致DNA难以溶解。

11. 加入1~2 ml Buffer TE，低速旋涡5秒，65°C孵育1小时溶解DNA，期间轻弹数次助溶。 - 20°C保存DNA。