

**血液基因组非柱式提取试剂盒(0.1-20 ml)**

项目号: F669942

储存条件: 2-8℃。

**产品内容**

组分	200ml
Buffer FG1	2×260 ml
Buffer FG2	120ml
Buffer GE	60ml
Proteinase K	12.5mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25ml

**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。

**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 0.1-20ml 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。
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。
  - 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 $\mu$ l 全血中提取基因组（以 300 $\mu$ l 血液处理量为例）

1. 取 300  $\mu$ l 全血于 2ml 离心管（自备）中，加入 300  $\mu$ l（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  $\mu$ l（1.5 倍样本体积）Buffer FG1，涡旋震荡，使沉淀完全分散。10,000g 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l Buffer FG2/Proteinase K 混合液，再次涡旋混匀。

5. 65 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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（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 200  $\mu$ l Buffer GE，低速涡旋 5 秒，65 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时溶解 DNA，期间轻弹数次助溶。-20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

注意：如果 DNA 没有完全溶解，可室温过夜。

二、从 1-5ml 全血中提取基因组（以 3ml 血液处理量为例）

1. 取 3ml 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 4.5ml（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：此混合液最好现用现配，并在配好后 1h 之内用完。

4. 加入 1.5ml 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  $\mu$ l BufferFG2/Proteinase K 混合液, 再次涡旋混匀。

5. 65°C 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 1.5ml 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 1.5ml 70%乙醇, 涡旋震荡 5 秒, 2,500 $\times$ 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  $\mu$ l Buffer GE, 低速涡旋 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。

注意: 如果 DNA 没有完全溶解, 可室温过夜。

三、从 6-20ml 全血中提取基因组 (以 10 ml 血液处理量为例)

1. 取 10ml 全血于 50ml 离心管 (自备) 中, 加入 10ml Buffer FG1, 上下颠倒混匀 5 次, 2,500 $\times$ g 离心 5 分钟。

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 $\times$ 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。

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

注意: 此混合液最好现用现配, 并在配好后 1h 之内用完。

4. 加入 5ml 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 BufferFG2/Proteinase K 混合液, 再次涡旋混匀。

5. 65°C 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 5ml 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 $\times$ 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 5ml 70%乙醇, 涡旋震荡 5 秒, 2,500 $\times$ 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 1ml 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) 异	0.5	1.5	5	15	25	50	100
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