版本号：04/2019

血液基因组非柱式提取试剂盒
说明书

【产品名称】

通用名称：核酸提取或纯化试剂
商品名称：血液基因组非柱式提取试剂盒
英文名称：FlexGen Blood DNA Kit

【包装规格】

500次/盒； 2000次/盒
此包装规格以每次处理0.1 ml血液样本计算，根据每次处理的样本量不同，可进行检验的次数有所变化。

【预期用途】

本试剂盒提供了一种快速、灵活的方法，适用于新鲜或冷冻全血（用柠檬酸盐、EDTA或肝素等抗凝剂处理过的样品）提取总DNA，包括基因组DNA和线粒体DNA。

【检验原理】

本品可以灵活处理0.1-20 ml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、脂类及其他抑制性杂质污染。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。

【主要组成成分】

	500 次/盒		2000 次/盒	
试剂名称	规格	数量	规格	数量
红细胞裂解液	65 ml /瓶	2 瓶	260 ml/瓶	2 瓶
裂解缓冲液	30 ml/瓶	1 瓶	120 ml/瓶	1 瓶
洗脱缓冲液	30 ml/瓶	1 瓶	60 ml/瓶	1 瓶
蛋白酶 K	3 mg/支	1 支	12.5 mg/支	1 支
蛋白酶 K 保存液	1.25 ml/支	1 支	1.25 ml/支	1 支

需要实验者自行准备的试剂：异丙醇、70%乙醇。

【储存条件及有效期】

红细胞裂解液2-8℃保存，其余组分0-35℃保存，有效期12个月。
可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1．适用样本类型：适用于处理各种血液和细胞样本。

2．样本处理与保存：新鲜血液需加入抗凝血剂，血液样品避免反复冻融。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。

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，血液样品在2-8℃储存不得超过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）。

3．样本运输：应采用冰壶或者泡沫箱加冰或干冰密封运输。

【检验方法】

实验前准备

向蛋白酶K中加入指定用量的蛋白酶K保存液使其溶解，终浓度为10 mg/ml，-20℃保存。

	500 次/盒	2000 次/盒
蛋白酶 K 保存液	加入 0.3 ml	加入 1.25 ml

1. 从100－900 μl全血中提取基因组（以300 μl血液处理量为例）

1.1 取300 μl 全血于2 ml离心管（自备）中，加入300 μl (样本等体积)红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，10,000 ×g离心20秒，弃上清。

1.2 再向离心管中加入450 μl (1.5倍样本体积) 红细胞裂解液，涡旋震荡，使沉淀完全分散。10,000×g离心20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。

1.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶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。

1.4 加入150 μl裂解缓冲液/蛋白酶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，加入裂解缓冲液/蛋白酶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 裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

1.5 65℃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。

1.6 加入150 μl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。

1.7 10,000×g离心3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。

1.8 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。

1.9 加入300 μl 70%乙醇，涡旋震荡5秒，10,000×g离心3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。

1.10 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。

1.11 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。

1.12 加入200 μl 洗脱缓冲液，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DNA没有完全溶解，可室温过夜。如使用少量的洗脱缓冲液溶解DNA，建议延长孵育时间。

2. 从1-5 ml全血中提取基因组（以3 ml血液处理量为例）

2.1 取3 ml全血于15 ml离心管（自备）中，加入3 ml（样本等体积）红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，2,500×g 离心5分钟，弃上清。

2.2 再向离心管中加入4.5ml（1.5倍样本体积）红细胞裂解液，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。将离心管倒置在吸水纸上，可以减少管壁上清的回流。

2.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶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。

2.4 加入1.5 ml 裂解缓冲液/蛋白酶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，加入裂解缓冲液/蛋白酶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 µl裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

2.5 65℃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。

2.6 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。

2.7 2,500×g 离心3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。

2.8 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。

2.9 加入1.5 ml 70%乙醇，涡旋震荡5秒，2,500×g 离心3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。

2.10 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。

2.11 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。

2.12 加入300 µl 洗脱缓冲液，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。如果使用少量的洗脱缓冲液溶解DNA，建议延长孵育时间。

3. 从6–20 ml全血中提取基因组（以10 ml血液处理量为例）

3.1 取10 ml全血于50 ml离心管（自备）中，加入10 ml（样本等体积）红细胞裂解液，上下颠倒混匀5次，2,500×g离心5分钟。

3.2 再向离心管中加入15 ml（1.5倍样本体积）红细胞裂解液，涡旋震荡，使沉淀完全分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。

3.3 按照附表配制裂解缓冲液与蛋白酶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。

3.4 加入5 ml裂解缓冲液/蛋白酶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，加入裂解缓冲液/蛋白酶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1 ml裂解缓冲液/蛋白酶K混合液，再次涡旋混匀。

3.5 65℃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。

3.6 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。

3.7 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。

3.8 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。

3.9 加入5 ml 70%乙醇，涡旋震荡5秒，2,500×g离心3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。

3.10 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。

3.11 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。

3.12 加入1 ml洗脱缓冲液，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。如果使用少量的洗脱缓冲液溶解DNA，建议延长孵育时间。

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
红细胞裂解液（μl）	250	750	2500	7500	12500	25000	50000
裂解缓冲液（μl）	50	150	500	1500	2500	5000	10000
蛋白酶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
洗脱缓冲液（μl）	100	200	200	300	500	1000	1000
补加裂解缓冲液/蛋白酶K混合液（μl）	10	30	100	300	500	1000	1000

【注意事项】

1．配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，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，以免断裂。

【基本信息】

生产企业名称：江苏康为世纪生物科技有限公司

住所：江苏省泰州市药城大道一号TQB大楼4楼

邮政编码：225300

电话：0523-86201183　　传真：0523-86816890

网址：www.cwbiotech.com

售后服务单位名称：江苏康为世纪生物科技有限公司

联系方式：0523-86201183

生产地址：泰州市药城大道一号TQB大楼4楼，泰州市中国医药城口泰路西侧、陆家路东侧G52幢58号1层、2层，59号4层东侧

生产备案凭证编号：苏泰食药监械生产备20140018号

【医疗器械备案凭证编号】苏泰械备20140032号

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2014年10月08日

修改日期：2019年04月10日