M5 FlexGen Blood DNA Kit (0.1-20ml)
使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 FlexGen Blood DNA Kit (0.1-20ml)	50ml	MF052-01
M5 FlexGen Blood DNA Kit (0.1-20ml)	200ml	MF052-04

【储存条件】
10×Buffer RCL 2-8˚C 保存，其他组分室温保存。

【试剂盒组分】

	MF052-01	MF052-04
10×Buffer RCL	25ml	100ml
Buffer GL	30ml	120ml
Buffer GE	15ml	60ml
Proteinase K	250 ul	1 ml

【产品简介】
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。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。

【产品特色】
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。

【自备仪器、试剂】
异丙醇、70%乙醇。

【实验前准备及注意事项】

1. 根据需要取相应量的 10×Buffer RCL 稀释成 1×工作液，1ml 血液需要 0.4ml 10×Buffer RCL。

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，所得的基因组 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˚C 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˚C 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˚C 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˚C 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 100-900μl 全血中提取基因组 DNA（以 300μl 血液处理量为例）

1. 取 300μl 全血于 2ml 离心管中，加入 600μl（2×**样本体积**）1×Buffer RCL，上下颠倒混匀，室温放置 3 min，10,000xg 离心 30 秒，弃上清。

2. 如果红色较重，再重复步骤 1 一次。
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 GL 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 150μl Buffer GL 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 BufferGL/Proteinase K 混合液立即涡旋振荡，不要等所有样品都加完了再振荡。
2） 通常涡旋振荡 3-5 次，每次 5 秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋振荡后发现沉淀中含胶状物质，可以再加入 30μl BufferGL/Proteinase K 混合液，再次涡旋混匀。

5. 65˚C 孵育 10 分钟，期间颠倒混匀数次。
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 150μl 异丙醇，上下颠倒彻底混匀直至出现丝状或者簇状基因组 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. 10,000xg 离心 5 分钟。如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或者增大离心力。

8. 弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。少数时候沉淀可能贴壁不牢，不要吸弃沉淀。

9. 加入 300μl 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒，10,000xg 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者增大离心力。

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。在管底可见白色的 DNA 沉淀，在极少数情况下沉淀可能会松弛，所以尽量缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 分钟）。乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切或者 PCR 等）实验，但避免过度干燥 DNA，因为过度干燥会使 DNA 难于溶解。

12. 加入 100 - 200μl 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。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 DNA（以 3ml 血液处理量为例）

1. 取 3ml 全血于 15ml 离心管中，加入 6ml（2×**样本体积**）1×Buffer RCL，上下颠倒混匀，室温放置 3 min，10,000xg 离心 30 秒，弃上清。

2. 如果红色较重，再重复步骤 1 一次。
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 BufferGL 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 1.5 ml BufferGL 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 BufferGL/Proteinase K 混合液立即涡旋振荡，不要等所有样品都加完了再振荡。
2） 通常涡旋振荡 3-5 次，每次 5 秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋振荡后发现沉淀中含胶状物质，可以再加入 300μl BufferGL/Proteinase K 混合液，再次涡旋混匀。

5. 65˚C 孵育 10-30 分钟，期间颠倒混匀数次。
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出现丝状或者簇状基因组 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。

7．2,500xg 离心 5 分钟。如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或者增大离心力。

8．弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。少数时候沉淀可能贴壁不牢，不要吸弃沉淀。

9．加入 1.5ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒，2,500xg 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者增大离心力。

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。在管底可见白色的 DNA 沉淀，在极少数情况下沉淀可能会松弛，所以尽量缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 分钟）。乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切或者 PCR 等）实验，但避免过度干燥 DNA，因为过度干燥会使 DNA 难于溶解。

12. 加入 300μl 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。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 DNA（以 10ml 血液处理量为例）

1．取 10ml 全血于 50ml 离心管中，加入 20ml（2×**样本体积**）1×Buffer RCL，上下颠倒混匀，室温放置 3 min，10,000xg 离心 30 秒，弃上清。

2．如果红色较重，再重复步骤 1 一次。
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 BufferGL 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 5 ml Buffer GL 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 BufferGL/Proteinase K 混合液立即涡旋振荡，不要等所有样品都加完了再振荡。
2） 通常涡旋振荡 3-5 次，每次 5 秒，可以使沉淀充分悬浮，如果涡旋振荡后发现沉淀中含胶状物质，可以再加入 1ml BufferGL/Proteinase K 混合液，再次涡旋混匀。

5．65˚C 孵育 10-30 分钟，期间颠倒混匀数次。
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出现丝状或者簇状基因组 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。

7．2,500xg 离心 5 分钟。如果沉淀贴壁不牢，可以适当延长离心时间或者增大离心力。

8．弃上清，并把离心管倒置于干净的吸水纸上吸干。少数时候沉淀可能贴壁不牢，不要吸弃沉淀。

9．加入 5ml 70%乙醇，涡旋振荡 5 秒，2,500xg 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者增大离心力。

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。在管底可见白色的 DNA 沉淀，在极少数情况下沉淀可能会松弛，所以尽量缓慢倒掉上清。

11. 空气干燥 DNA 沉淀直至所有的液体挥发干净（至少 5 分钟）。乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切或者 PCR 等）实验，但避免过度干燥 DNA，因为过度干燥会使 DNA 难于溶解。

12. 加入 1ml 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。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】

血液体积的体积(μl)：	100	300	1000	3000	5000	10000	20000
1×Buffer RCL (μl)	400	1200	4000	12000	20000	40000	80000
Buffer GL (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 Buffer GL 和 Proteinase K 混合液	10	30	100	300	500	1000	1000

Mei5bio

【备注】
本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。