

AxyPrep 血基因组 DNA 大量试剂盒

本试剂盒采用独特的两相分离技术,结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到纯化基因组 DNA 的目的。适合从 5 ml 的抗凝人或哺乳动物全血,或 500 μ l 抗凝鸟类或两栖动物全血中获得多至 250 μ g 的基因组 DNA。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

说明书,耗材:DNA 制备管、中量滤器、连接管。

Buffer VL: 细胞和病毒裂解液,室温密闭贮存。

Buffer G-B: 蛋白沉淀液,室温密闭贮存。

Buffer DV-A: Buffer DV 的制备液。请参照实验准备 Buffer DV 的配制方法配制,室温密闭贮存。

Buffer DV: 相分离液,室温密闭贮存。

Buffer BV: DNA 结合液,室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液,室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前,按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇,混合均匀,室温密闭贮存。可用 100%乙醇或 95%乙醇。

Eluent: 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 室温密闭贮存。

二、注意事项

1. 下列操作步骤适合从 5 ml 的抗凝人或哺乳动物全血,或 500 μ l 抗凝鸟类或两栖动物全血中获得多至 250 μ g 的基因组 DNA。
2. **Buffer VL, Buffer BV 和 Buffer W1** 含刺激性化合物,操作时要戴乳胶手套和眼镜,避免沾染皮肤、眼睛和衣服,谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时,要立即用大量清水和生理盐水冲洗,必要时寻求医疗咨询。
3. 在按照此说明书操作前,请确保已做好足够的对血传播病毒的防护工作,按照正确方法处理体液和感染体。
4. 操作时严格按操作步骤进行,废物必须放入含消毒液的废物缸,并高压灭菌。

三、实验准备

1. 第一次使用时,在 **Buffer W2 concentrate** 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 制备 **Buffer DV:** 取 4 ml **Buffer DV-A**, 250 ml 异丙醇, 150 ml 异丁醇,加入提供的 500 ml 试剂瓶中,混合均匀。
4. 4 $^{\circ}$ C 预冷 **Buffer DV**。

四、操作步骤

【DNA 释放】

1. 将 5 ml 抗凝全血置于一 50 ml 离心管中，若全血样本体积不足 5 ml，用 PBS 补充至 5 ml。
2. 加入 10 ml Buffer VL，盖紧离心管帽，旋涡振荡 1 min。
3. 加入 10 ml Buffer G-B，再次盖紧离心管帽，立刻上下混匀。

【两相分离去除蛋白和其它杂质】

4. 加入 20 ml Buffer DV (4℃ 预冷)，用力混合均匀。≥5,000×g 离心 5 min。

* 请在实验前按照第一页准备 Buffer DV。

5. 尽可能丢弃上相，保留相间沉淀和下相。加入 20 ml 4℃ 预冷 Buffer DV，用力混合，≥5,000×g 离心 5 min。

【基因组 DNA 的纯化】

6. 丢弃上相，将下相转移至中量滤器中（滤器置于另一 50 ml 离心管中），将活塞插入注射器，缓慢推动活塞，收集 50 ml 离心管中的滤液。

* 上相必须完全弃尽。

7. 弃滤器，在滤液中加入 10 ml Buffer BV，混合均匀。
8. 将 DNA 大量制备管插到负压装置的插口上，将步骤 7 的混合液移到制备管中，开启并调节负压装置至-20-30 英寸汞柱。
9. 待步骤 8 管中液体都吸尽后，加入 15 ml Buffer W1，吸尽管中液体，保持负压。
10. 加入 20 ml 已加入乙醇的 Buffer W2，吸尽管中液体，关闭负压装置。

* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

11. 将大量制备管从负压装置转移至另一洁净的 50 ml 离心管中，≥6,000×g 离心 5 min。
12. 将大量制备管插回到负压装置的插口上，保持负压 5 min，吸尽残存的 Buffer W2。
13. 将大量制备管置于另一洁净的 50 ml 离心管中，在 silica 膜中央加 1.5 ml Eluent 或去离子水，室温静置 5 min，≥6,000×g 离心 5 min 洗脱 DNA。

* 将去离子水或 Eluent 加热至 65℃ 将提高洗脱效率。

14. 可选步骤：同样方法，在 silica 膜中央加 0.75 ml Eluent 或去离子水，室温静置 1 min，≥6,000×g 离心 5 min 洗脱 DNA。