

## AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量试剂盒

本试剂盒采用独特的细胞裂解和相分离技术，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。适合于从  $1.0 \times 10^9$  细菌中获得多至 20  $\mu\text{g}$  的基因组 DNA。用于 PCR、Southern 印迹分析、RAPD、RFLD 等分子生物学实验。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

说明书，耗材：DNA 制备管，小量滤器，2 ml 离心管，1.5 ml 离心管。

RNase A: 50 mg/ml，室温保存。

溶菌酶：50%甘油溶解溶菌酶，使溶菌酶浓度为 50 mg/ml， $-20^\circ\text{C}$  密闭贮存。

Buffer S: 细菌原生质制备液，加入 RNase A 后， $4^\circ\text{C}$  密闭贮存。

0.25M EDTA: 室温密闭贮存。

Buffer G-A: 裂解液，室温密闭贮存。

Buffer G-B: 蛋白去除液，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并混合均匀，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

Buffer G-B、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，要立即用大量水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

### 三、实验准备

1. 第一次使用时，在 Buffer W2 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇并混合均匀。
2. 准备 Buffer DV: 取 2 ml Buffer DV-A, 125 ml 异丙醇, 75 ml 异丁醇, 加入提供的 250 ml 试剂瓶中, 混合均匀。
3.  $4^\circ\text{C}$  预冷 Buffer DV。
4. 第一次使用试剂盒时, 用 50%甘油溶解溶菌酶, 使溶菌酶浓度为 50 mg/ml。
5. 第一次使用试剂盒时将随试剂盒携带的 RNase A 全部加入 Buffer S 中, 混合均匀。
6. 准备  $65^\circ\text{C}$  水浴。
7. 检查 Buffer G-A 和 Buffer G-B 是否出现沉淀, 若出现沉淀, 于  $65^\circ\text{C}$  水浴加热至沉淀完全溶解后再使用。
8. 将 Eluent 或去离子水加热至  $65^\circ\text{C}$  有利于基因组 DNA 的充分洗脱。

## 四、操作步骤

1. 用 2 ml 离心管收集  $1.0 \times 10^9$  (1 ml 菌液  $OD_{600}$  为 1-1.5) 的细菌培养物,  $12,000 \times g$  离心 30 s, 弃尽上清。用 150  $\mu$ l 已加入 RNase A 的 Buffer S 悬浮沉淀。

- \* 确认 RNase A 已加入 Buffer S 中。
- \* 悬浮需均匀, 不应留有小的菌块, 否则将影响溶菌效果。

2. 加入 20  $\mu$ l 溶菌酶贮存液, 混合均匀, 室温静置 5 min。
3. 加入 30  $\mu$ l 0.25 M EDTA (pH 8.0), 混合均匀, 冰浴 5 min。
4. 加入 450  $\mu$ l Buffer G-A, 旋涡振荡 15 s,  $65^\circ\text{C}$  水浴 10 min。
5. 加入 400  $\mu$ l Buffer G-B 和 1 ml Buffer DV ( $4^\circ\text{C}$  预冷), 用力混合,  $12,000 \times g$  离心 2 min。

- \* 请在实验前按照实验准备步骤 2 内容, 准备 Buffer DV。

6. 尽可能丢弃上相, 保留相间沉淀和下相。加入 1 ml  $4^\circ\text{C}$  预冷 Buffer DV, 用力混合,  $12,000 \times g$  离心 2 min。
7. 丢弃上相, 将下相转移至滤器 (滤器置于 2 ml 离心管中)。  $12,000 \times g$  离心 1 min。

- \* 上相无需完全弃尽, 在转移无色下相时偶有混入的上相, 可在 Tip 头内迅速分相, 便于丢弃。
- \* 如在转移过程中吸入少量界面沉淀, 不必去除, 可过滤除去。
- \* 有色上相务必除尽, 否则将抑制 DNA 结合到 silica 膜上。

8. 弃滤器, 在滤液中加入 400  $\mu$ l Buffer BV, 混合均匀。

### 步骤 9-12 可选择离心法或负压法

#### A. 负压法

- 9A. 将制备管插到负压装置的插口上, 将步骤 8 中的混合液移入制备管中, 开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱, 吸尽管中溶液。
- 10A. 保持负压, 加入 500  $\mu$ l Buffer W1, 吸尽管中溶液。
- 11A. 保持负压, 沿管壁四周加入 700  $\mu$ l Buffer W2, 吸尽管中溶液; 以同样的方法再用 700  $\mu$ l Buffer W2 洗涤一次。

- \* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
- \* 沿管壁四周加入 Buffer W2 有助于彻底冲洗沾附在管壁上的盐份。
- \* 两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除, 消除对酶切反应的影响。

- 12A. 将制备管置于一个 2 ml 离心管中,  $12,000 \times g$  离心 1 min。

**B. 离心法**

9B. 将制备管置于 2 ml 离心管中，将步骤 8 中的混合液移入制备管中，12,000×g 离心 1 min。

10B. 弃滤液，将制备管置回到原 2 ml 离心管中，加入 500 μl Buffer W1，12,000×g 离心 1 min。

11B. 弃滤液，将制备管置回到原 2 ml 离心管中，加入 700 μl Buffer W2，12,000×g 离心 1 min。

以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次。

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

\* 两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。

12B. 弃滤液，将制备管置回到原 2 ml 离心管中，12,000×g 离心 1 min。

13. 将制备管置于另一洁净的 1.5 ml 离心管中，在 silica 膜中央加 100-200 μl Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000×g 离心 1 min 洗脱 DNA。

\* 将去离子水或 Eluent 加热至 65°C 将提高洗脱效率。