

## AxyPrep-96 血基因组 DNA 试剂盒

本试剂盒采用特殊的细胞裂解和蛋白去除液（包括蛋白酶 K 裂解）从抗凝全血中得到基因组 DNA。适用于从冻全血、血浆、血清、骨髓、其他体液、淋巴细胞、培养细胞、病毒和线粒体中提取 DNA。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

说明书, 耗材: 96 孔深孔板 (1.6 ml), 96 圆孔板, 96 孔 DNA 制备板, 96 圆孔硅胶片, BF-400 膜。

**Proteinase K:** 冻干的蛋白酶 K 可室温贮存 6 个月, 长时间保存请置于 4℃; 溶解后, 在 2-8℃ 可贮存 2 个月, 长时间保存请勿置于室温中。

**Buffer PK:** 蛋白酶 K 溶解液, 室温密闭贮存。

**Buffer BL:** 细胞裂解液, 室温密闭贮存。

**Buffer W1B concentrate:** 洗涤液。使用前, 根据瓶上数量加入乙醇, 混合均匀, 室温密闭贮存。可用 100%乙醇或 95%乙醇。

**Buffer W2 concentrate:** 去盐液。使用前, 根据瓶上数量加入乙醇, 混合均匀, 室温密闭贮存。可用 100%乙醇或 95%乙醇。

**10×Buffer W2 (12×96 试剂盒):** 用于配制 Buffer W2。

**Eluent B:** 7.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.3 mM EDTA, 室温密闭贮存。

### 二、注意事项

Buffer BL 和 Buffer W1B 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。

### 三、实验准备

1. 第一次使用时, 在 Buffer W2 concentrate 和 Buffer W1B concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
2. Buffer W2 (12×96 试剂盒) 配制: 在提供的 500 ml 空瓶中加入 15 ml 10×Buffer W2, 135 ml 去离子水和 350 ml 乙醇, 可用 100%无水乙醇或 95%乙醇。
3. 根据瓶上标签将蛋白酶 K 溶解于 Buffer PK 中, 请勿旋涡振荡。
4. 准备 70℃温浴。
5. 使用前检查 Buffer BL 是否有沉淀析出, 若出现沉淀, 请于 70℃温浴加热至沉淀完全溶解后再使用。

#### 四、操作步骤

1. 向 96 圆孔板的每孔中加入 20  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K。
2. 加 200  $\mu\text{l}$  抗凝全血到 96 圆孔板中。
  - \* 若全血样品体积少于 200  $\mu\text{l}$ ，用 PBS 补充到 200  $\mu\text{l}$ 。
  - \* 若样品为鸟类血，样品用量须低于 10  $\mu\text{l}$ 。
  - \* 若需得到 RNA-free 的基因组 DNA，在步骤 3 加入 Buffer BL 前加入 DNase-free 的 RNase A(20 mg/ml)。
3. 加 200  $\mu\text{l}$  Buffer BL，注意不要打湿每孔的边缘，用 96 圆孔硅胶片密封各孔。
4. 用力混合 30 s。
5. 3000 rpm 简短离心使 96 圆孔硅胶片上的溶液到 96 圆孔板内。启动离心机，当速度达到 3000 rpm 后即停止。
6. 在培养箱或烘箱中 70 $^{\circ}\text{C}$  温浴至少 10 min。
7. 3000 rpm 简短离心使 96 圆孔硅胶片上的溶液到 96 圆孔板内。启动离心机，当速度达到 3000 rpm 后即停止。
8. 取下 96 圆孔硅胶片，每孔加入 200  $\mu\text{l}$  乙醇（96-100%）。
9. 用 96 圆孔硅胶片密封各孔，用力混匀混合 15 s。3000 rpm 简短离心使 96 圆孔硅胶片上的溶液到圆孔板内。启动离心机，当速度达到 3000 rpm 后即停止。
10. 将 96 孔 DNA 板放到一洁净的 96 孔 1.6 ml 深孔板。取下圆孔板上的 96 圆孔硅胶片，将每孔中的溶液转移至 96 孔 DNA 板中，6000 rpm 离心 4 min。
11. 丢弃 96 孔 1.6 ml 深孔板的滤液，将 96 孔 DNA 板放回到 96 孔 1.6 ml 深孔板上，每孔加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer W1B，用一新的 BF-400 膜密封 96 孔 DNA 板，6000 rpm 离心 4 min。
  - \* 确认在 Buffer W1B concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
12. 丢弃 96 孔 1.6 ml 深孔板的滤液，将 96 孔 DNA 板放回到 96 孔 1.6 ml 深孔板上，每孔加入 850  $\mu\text{l}$  Buffer W2，用另一新的 BF-400 膜密封 96 孔 DNA 板，6000 rpm 离心 4 min。
  - \* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
13. 弃滤液，将 96 孔 DNA 板放回到 96 孔 1.6 ml 深孔板上，每孔加入 400  $\mu\text{l}$  Buffer W2，用另一新的 BF-400 膜密封 96 孔 DNA 板，6000 rpm 离心 4 min。
14. 将 96 孔 DNA 板放在一洁净的 96 孔 1.6 ml 深孔板上，用 BF-400 膜密封 96 孔 DNA 板，6000 rpm 离心 15 min。
15. 将 96 孔 DNA 板放在另一洁净的 96 孔 1.6 ml 深孔板上，每孔加入 100-200  $\mu\text{l}$  Eluent B 或去离子水，室温静置 2 min，用另一新的 BF-400 膜密封 96 孔 DNA 板，6000 rpm 离心 4 min 洗脱得到 DNA。