

AxyPrep 基因组DNA小量试剂盒

本试剂盒采用独特的裂解和蛋白酶 K 消化技术，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。每次制备可获得多至 20 μ 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

Cat. No.	AP-MN-MS-GDNA-4	AP-MN- MS-GDNA-50
制备次数	4 preps	50 preps
Miniprep column	4	50
2 ml 离心管	8	100
1.5 ml 离心管	4	50
RNase A	10 μ l	60 μ l
Buffer C-L	1 ml	9 ml
Proteinase K	1.2 mg	18 mg
PK Buffer	90 μ l	1.2 ml
Buffer P-D	2 ml	25 ml
Buffer W1	3 ml	30 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml
Eluent	1 ml	12 ml
说明书	1	1

Miniprep column: 小量制备管。室温密闭贮存。

RNase A: 50 mg/ml, 室温保存。

Buffer C-L: 裂解液, 室温密闭贮存。

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 $^{\circ}$ C; 溶解后, 在2-8 $^{\circ}$ C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 P-D: 蛋白去除液, 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

Buffer C-L、Buffer P-D 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 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇并混合均匀。
2. 根据瓶上标签将蛋白酶K溶解于Buffer PK 中，请勿旋涡振荡。
3. 准备56℃水浴。
4. 使用前检查Buffer C-L是否有沉淀析出，若出现沉淀，请于37℃水浴加热至沉淀完全溶解后再使用。
5. 将Eluent或去离子水加热至65℃有利于基因组DNA的充分洗脱。

四、操作步骤

步骤1-5 请根据不同的样品选择相应的操作，匀浆、裂解和除蛋白质及其它杂质。

【从动物组织中提取基因组DNA】

1. 取1-20 mg 动物或人组织，移入冰水浴预冷的研钵中，快速、用力研磨成匀浆。
 - * 下列组织请加液氮研磨至粉末状后，将研钵置于56℃水浴，当粉末开始融化时继续研磨1 min，匀浆后加入350μl PBS 和0.9 μl RNase A，再进入步骤3 的操作下。
 - A. 富含DNA 酶的胰脏，脾脏，胸腺，淋巴等组织。
 - B. 富含胶原蛋白的皮肤、肌腱等组织。
 - C. 富含角质蛋白的组织或坚硬的组织如骨骼等。
2. 加入350 μl Buffer PBS 和0.9 μl RNase A 后温和地研磨30 s。
3. 收集350 μl 研磨好的组织匀浆并转入2 ml 离心管。如匀浆体积不足350 μl，补充PBS 至350 μl。
4. 加入150 μl Buffer C-L和20 μl Proteinase K。立即漩涡振荡 1min 混合均匀。短暂离心后，将离心管置56℃水浴 10 min。
 - * 不要将Proteinase K直接加到Buffer C-L中。
5. 加入350 μl Buffer P-D，漩涡振荡 30s 混合均匀，12,000×g 离心10 min。

【从植物组织中提取基因组DNA】

1. 按下表称取适量的新鲜植物组织（如选用的是冷冻干燥的组织，则组织用量减半）。剪成小块放入研钵中；加入液氮，使组织冷冻完全后，快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止组织融化，研磨充分后将研钵放入56℃水浴至样品粉末刚开始融化。
 - * 表1 新鲜植物样品使用量按下表收集

植物花或叶片	10-100 mg
植物茎	≤ 240 mg
植物根	≤ 240 mg
植物种子	≤ 240 mg

- * 样品研磨应充分，否则严重影响基因组DNA 的得率。
- * 如从培养的植物细胞中提取基因组DNA，收集 2×10^3 - 1×10^7 培养的植物细胞，10,000×g 离心1 min，加入

150 μ l PBS 充分悬浮细胞并转入研钵中，加入液氮，使组织冷冻完全后，快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止组织融化，研磨充分后将研钵放入56 $^{\circ}$ C水浴至样品粉末刚开始融化。

2. 加入350 μ l PBS 和0.9 μ l RNase A 贮存液，用力碾磨30 s。
 - * 如新鲜植物叶超过120 mg 或干植物叶超过60 mg，加入700 μ l PBS。按照步骤2完全操作后，将匀浆样品分到两个2 ml 离心管中，然后按照步骤4-5平行操作两管，第6步和接下来的步骤合并到一管操作，以提高洗脱的DNA 的浓度。
3. 转移350 μ l 研磨好的匀浆至2 ml 离心管中，如匀浆体积不足350 μ l，补充PBS至350 μ l。
4. 加入150 μ l Buffer C-L和20 μ l Proteinase K。立即漩涡振荡 1min 混合均匀。短暂离心后,将离心管置56 $^{\circ}$ C水浴 10 min。
 - * 不要将Proteinase K直接加到Buffer C-L中。
 - * 富含纤维的根/茎等组织或富含淀粉、蛋白质的种子等样品，可延长水浴时间至30 min。
5. 加入350 μ l Buffer P-D，漩涡振荡 30s 混合均匀，12,000 \times g 离心10 min。

【从培养细胞、淋巴细胞、骨髓、干血和骨头中提取基因组DNA】

根据培养细胞的类型来操作，若从植物细胞中提取基因组DNA，请按步骤(从植物组织中提取基因组DNA)来匀浆。

- A. 悬浮培养的动物细胞或新鲜分离的动物组织单细胞悬液
 - 1A. 用2 ml 离心管收集 1×10^3 - 2×10^6 细胞悬浮液，2,000 \times g 离心5 min，弃尽上清。
 - 2A. 加入350 μ l 去离子水或PBS 悬浮细胞。
- B. 单个细胞培养或96 孔板、24 孔板、12 孔板和6 孔板细胞培养
 - 1B. 尽可能的丢掉上清液，加350 μ l PBS 到每孔中，室温静置1 min。
 - 2B. 用吸头来回吸注几次，转移350 μ l匀浆至2 ml 离心管，如匀浆体积不足350 μ l，补足PBS至350 μ l。
- C. 淋巴细胞
 - 1C. 加350 μ l PBS 到每孔中，室温静置1 min。
 - 2C. 用吸头来回吸注几次，转移350 μ l 匀浆至2 ml 离心管，如匀浆体积不足350 μ l，补足 PBS 至350 μ l。
- D. 骨髓
 - 1D. 切除骨头的两端，用针头吸350 μ l PBS从骨头一端冲出骨髓。
 - 2D. 用吸头来回吸注几次，转移350 μ l 匀浆至2 ml 离心管，如匀浆体积不足350 μ l，补足 PBS 至350 μ l。
- E. 干血
 - 1E. 加350 μ l PBS 到每孔中，室温静置1 min。
 - 2E. 用吸头来回吸注几次，至干血完全溶解，如匀浆体积不足350 μ l，补足 PBS 至350 μ l。

F. 骨头

- 1F. 取10-50 mg 骨头，移入冰水浴预冷的研钵中，快速、用力研磨成匀浆；加入350 μ l PBS，用力碾磨30 s。
 - 2F. 用吸头来回吸注几次，转移350 μ l 匀浆至2 ml 离心管，如匀浆体积不足350 μ l，补足 PBS 至350 μ l。
3. 加入0.8 μ l RNase A，漩涡振荡 15s，室温静置 1min。
 4. 加入150 μ l Buffer C-L和8 μ l Proteinase K。立即漩涡振荡 1min 混合均匀。短暂离心后,将离心管置56 $^{\circ}$ C水浴 10 min。
 - * 不要将Proteinase K直接加到Buffer C-L中。
 5. 加入350 μ l Buffer P-D，漩涡振荡 30s 混合均匀，12,000 \times g 离心10 min。

【从酵母中提取基因组DNA】

1. 收集 2×10^6 - 5×10^7 酵母细胞，10,000 \times g 离心 1min。用350 μ l PBS 悬浮酵母细胞并转移至研钵中，加入液氮，待样品被完全冷冻后，快速、用力研磨至粉末状。将研钵放入56 $^{\circ}$ C水浴至样品粉末刚开始融化时进入下一步操作。
 - * 当OD600 为 1 时，酵母浓度为 3×10^7 细胞/ml。
 - * 酵母细胞壁较为坚韧，应当适当延长研磨时间和研磨次数以确保充分破碎酵母细胞壁。
 - * 研磨时应及时加入液氮，防止样品在研磨时融化。
2. 加入1.2 μ l RNase A 贮存液，快速用力碾磨30 s。
3. 转移350 μ l 研磨好的匀浆至2 ml 离心管中，如匀浆体积不足350 μ l，补充PBS 至350 μ l。
4. 加入150 μ l Buffer C-L和20 μ l Proteinase K。立即漩涡振荡 1min 混合均匀。短暂离心后,将离心管置56 $^{\circ}$ C水浴 10 min。
 - * 不要将Proteinase K直接加到Buffer C-L中。
5. 加入350 μ l Buffer P-D，漩涡振荡 30s 混合均匀，12,000 \times g 离心10 min。

步骤6-10，可选择负压法或离心法

A. 负压法

- 6A. 将DNA 制备管插到负压装置的插口上，将步骤5的离心后的上清液移到制备管中，开启并调节负压装置至-20-30 英寸汞柱。
- 7A. 保持负压，加入500 μ l Buffer W1，吸尽管中液体。
- 8A. 保持负压，加入700 μ l 已加入乙醇的Buffer W2，吸尽管中液体；以同样的方法再用700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
 - * 确认在Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
 - * 沿管壁加入Buffer W2 有助于彻底冲洗附在管壁上的盐分。
 - * 两次用Buffer W2 冲洗能确保盐分被完全消除，消除对酶切反应的影响。
- 9A. 将DNA 制备管放回2 ml 离心管中，12,000 \times g 离心1 min。

B. 离心法

6B. 将DNA制备管置于2 ml 离心管中，将步骤5中的混合液移至制备管中，12,000×g离心1 min。

7B. 弃滤液，将制备管置回到原来的2 ml 离心管中，加入500μl Buffer W1，12,000×g离心1 min。

8B. 弃滤液，将制备管置回到原来的2 ml 离心管中，加入700μl Buffer W2，12,000×g离心1 min，以同样的方法，用700μl Buffer W2 再洗涤一次。

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

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

9B. 弃滤液，将制备管置回原来的2 ml 离心管中，12,000×g 离心1 min。

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

* 将去离子水或Eluent 加热至65℃将提高洗脱效率。

五、流程图

加入 350 μl PBS
按说明书要求加入 RNase A

加入 150 μl Buffer C-L
按说明书要求加入 Proteinase K
56°C 水浴 10 min

加入 350 μl Buffer P-D

加入 500 μl Buffer W1
加入 700 μl Buffer W2
加入 700 μl Buffer W2

加入 100-200 μl Eluent 或去离子水

