

AxyPrep 血基因组 DNA 中量试剂盒

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3 ml的抗凝人或哺乳动物全血获得100 µg的基因组DNA，抗凝鸟类或两栖动物全血中获得多至120 µg的基因组DNA。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

说明书，耗材：中量制备管、中量滤器、连接管、塑料扳手、中量管盖。

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，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。

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

二、注意事项

1. 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。
2. 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源。
3. 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 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。
4. 4°C 预冷 Buffer DV。

四、操作步骤

【DNA 释放】

1. 将 3 ml 抗凝全血加入一 50 ml 离心管中，若全血样本体积不足 3 ml，用 PBS 补充至 3 ml。
2. 加入 6 ml Buffer VL，盖紧离心管帽，旋涡振荡 1 min。
3. 加入 6 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 12 ml Buffer DV (4℃ 预冷)，用力混合均匀。≥5,000×g 离心 5 min。

* 请在实验前按实验准备中提供的方法准备 Buffer DV。

5. 尽可能吸尽蓝色上相，保留相间沉淀和下相。加入 12 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。

* 如在转移过程中下相没有任何界面沉淀，步骤 6 可以省略。

7. 弃滤器，在滤液中加入 6 ml Buffer BV，混合均匀。
8. 将连结管插到负压装置的插口上，再将 DNA 中量制备管插到连结管上。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，吸尽管中液体。
9. 保持负压，加入 8 ml Buffer W1，吸尽管中液体。
10. 保持负压，加入 9 ml 已加入乙醇的 Buffer W2，吸尽管中液体。

* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

11. 用塑料扳手将中量制备管中的 DNA 结合部分从负压装置转移至另一洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 0.3 ml Buffer W2，盖上中量制备管盖后，12,000×g 离心 2 min。
12. 将 DNA 结合部分置于另一洁净的 1.5 ml 离心管中，在 silica 膜中央加 0.5 ml Eluent 或去离子水，盖上中量制备管盖后，室温静置 2 min，12,000×g 离心 1 min 洗脱 DNA。

* 将去离子水或 Eluent 加热至 65℃ 将提高洗脱效率。

13. 可选步骤：同样方法，在 silica 膜中央加 0.25 ml Eluent 或去离子水，盖上中量制备管盖后，室温静置 1 min，12,000×g 离心 1 min 洗脱 DNA。