

## UE 血基因组 DNA 中量制备试剂盒

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，或 100 μl 抗凝鸟类或两栖动物全血中获得多至 100 μg 的基因组 DNA。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No	UE-MD-BL-GDNA-10	UE-MD-BL-GDNA-25
Kit size	10 preps	25 preps
Midiprep column	10	25
Column adapter	10	25
1.5 ml microfuge tube	20	50
Plastic wrench	1	1
Buffer VL	72 ml	180 ml
Buffer G-B	72 ml	180 ml
Buffer DV bottle (empty)	1	1
Buffer DV-A	5 ml	10 ml
Buffer BV	72 ml	180 ml
Buffer W1	96 ml	2×120 ml
Buffer W2 concentrate	36 ml	2×72 ml
Eluent	10 ml	20 ml
Protocol manual	1	1

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 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（可用 100%乙醇或 95%乙醇），混合均匀，室温密闭贮存。

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: 按 2 ml Buffer DV-A, 125 ml 异丙醇, 75 ml 异丁醇的比例，加入提供的试剂瓶中，混合均匀。
4. 4°C 预冷 Buffer DV。

### 四、操作步骤

#### 【DNA 释放】

1. 将 3 ml 抗凝全血加入一个 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 6 ml Buffer VL，盖紧离心管帽，漩涡振荡 1 min。
3. 加 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】

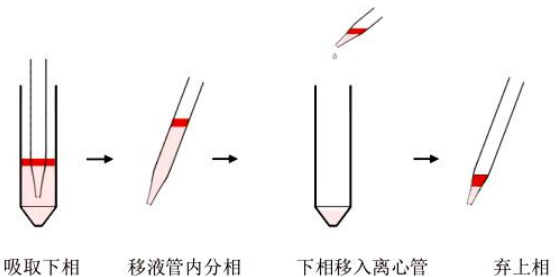
4. 加 12 ml Buffer DV (4°C 预冷)，用力混合均匀，≥5,000×g 离心 5 min。

\*请在实验前按实验准备的步骤 3 制备 Buffer DV。

5. 尽可能吸尽蓝色上相，保留相间沉淀和下相。加 12 ml, 4°C 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，将下相转移至一新的 50 ml 离心管（自备）中。  
\*上相必须完全弃尽。



7. 加 6 ml Buffer BV，混合均匀。
8. 将连接管插到负压装置的插口上，再将中量制备管插到连接管上。将步骤 7 的混合液移到中量制备管中，开启并调节负压至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中液体。
9. 保持负压，加 8 ml Buffer W1，吸尽管中液体。
10. 保持负压，加 9 ml 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. 用塑料扳手取下中量制备管下部含基因组 DNA 的制备管管头并置于一洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加 0.3 ml Buffer W2，12,000×g 离心 2 min。  
\*两次使用 Buffer W2 冲洗能够确保盐分被完全清除，消除对酶切反应的影响。
12. 将中量制备管管头置于另一洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 0.5 ml Eluent 或去离子水，盖上中量制备管管盖后，室温静置 2 min，12,000×g 离心 1 min 洗脱基因组 DNA。  
\*将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 将提高洗脱效率。
13. 可选步骤：同样方法，在制备管膜中央加 0.25 ml Eluent 或去离子水，盖上中量制备管管盖后，室温静置 1 min，12,000×g 离心 1 min 洗脱基因组 DNA。

## 五、流程图

加 3 ml 抗凝全血在 50 ml 离心管里  
加 6 ml Buffer VL, 漩涡振荡 1 min



DNA 释放

加 6 ml Buffer G-B  
加 12 ml 4°C 预冷的 Buffer DV,  
≥5,000×g, 离心 5 min



两相分离

弃上相, 加 12 ml 4°C 预冷的 Buffer DV,  
≥5,000×g, 离心 5 min



加 6 ml Buffer BV 在过滤液中



结合  
洗涤

加 8 ml Buffer W1  
加 9 ml Buffer W2  
加 0.3 ml Buffer W2



洗脱

加 0.5 ml Eluent 或去离子水  
可选步骤：再加 0.25 ml Eluent 或去离子水