

UE 血基因组 DNA 中量制备试剂盒 (定制)

本试剂盒采用独特的细胞裂解和血红素/蛋白沉淀技术，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。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MD-FBL-GDNA-20
Kit size	20 preps
Midiprep column	20
Plunger	20
1.5 ml microfuge tube	20
2 ml microfuge tube	20
Plastic wrench	1
Buffer AP1	120 ml
Buffer AP2	25 ml
Buffer W1A	96 ml
Buffer W2 concentrate	45 ml*2
Buffer TE	10 ml
Protocol manual	1

Buffer AP1: 细胞裂解液，室温密闭贮存。

Buffer AP2: 蛋白沉淀液，室温密闭贮存。

Buffer W1A concentrate: 洗涤液。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。

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。

Buffer TE: 洗脱液。室温密闭贮存。

二、注意事项

1. 如果从鸟类、两栖类或更低级的动物中提取基因组 DNA，因其血液中红细胞有核，血液用量勿超过 100 μ l，并加 PBS 溶液将血样体积稀释到 2000 μ l 后再按正常步骤操作。
2. Buffer AP1 和 Buffer W1A 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。
3. 为了保持基因组 DNA 的性能的完整性以及 PCR 扩增的特异性，纯化的基因组 DNA 应用含有 0.1 mM EDTA 的低盐浓度的 Tris 缓冲液洗脱和贮存。

三、实验准备

1. 第一次使用时，在 Buffer W2 concentrate 和 Buffer W1A concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇，并标记于瓶盖上。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 准备 65°C 水浴。

四、操作步骤

1. 加 5 ml Buffer AP1 到新鲜或者 -80°C 冻存 2 ml 血样（血样保存在 15 ml 离心管或 10 ml 采血管）中，盖紧离心管盖子，漩涡振荡 1 min 或者剧烈颠倒混匀 1 min。同时必须确保血样已经完全融化。
*必须充分混合或漩涡振荡以确保完全释放基因组 DNA。
*如果采血管体积小于 10 ml，建议先加部分 AP1 至采血管中，漩涡振荡至样品融化，再将溶液转移至 15 ml 离心管中，可以避免反复冻融引起的基因组 DNA 降解。
2. 加 1 ml Buffer AP2，立即剧烈颠倒混匀 30 s。
3. 4,630 \times g 离心 15 min。或者 8,000 \times g 离心 10 min。

步骤 4-7 可以选择负压法或推杆法。

A. 负压法：

- 4A. 准备负压装置，将标记好的中量制备管，插于负压抽气孔中。将离心上清液转移至中量制备管中。开启并调节负压泵压力至 -20-30 英寸汞柱，吸尽管中液体。

*-25-30 英寸汞柱相当于 -850-1,000 mbar 或者 -12-15 psi。

- 5A. 保持负压，加 7 ml Buffer W1A，吸尽管中液体。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

- 6A. 保持负压，加 8 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。

- 7A. (可选步骤) 保持负压，加 4 ml Buffer W2，吸尽管中液体。

*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。

B. 推杆法：

- 4B. 吸取步骤 3 中的混合液，转移到中量制备管中，插入推杆，垂直向下缓慢推注至 50 ml 离心管中，直至液体完全被推净。

*每次使用推杆时勿将推杆直接接触液体，以免造成污染。

- 5B. 取出推杆，加 7 ml Buffer W1A 至中量制备管中，将推杆插入制备管中，垂直向下缓慢推注，直至液体完全被推净。

*确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

- 6B. 取出推杆，加 8 ml Buffer W2 至制备管中，将推杆插入制备管中，垂直向下缓慢推注，至液体完全被推净。

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

- 7B. (可选步骤) 取出推杆，加 4 ml Buffer W2 至制备管中，将推杆插入制备管中，垂直向下缓慢推注，至液体完全被推净。

*每次使用推杆时勿将推杆直接接触液体，以免造成污染。

*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。

8. 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 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 \times g 离心 2 min。

*确保残留的乙醇被完全清除，消除对后续实验的影响。

9. 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 0.4 ml Buffer TE 或去离子水，室温静置 5 min，12,000 \times g 离心 2 min 洗脱基因组 DNA。-80°C 保存样品。

*将 Buffer TE 或去离子水加热至 65°C 将提高洗脱效率。

五、流程图

2ml 新鲜/冻存血样
加入 5ml Buffer AP1，剧烈混匀

裂解



加入 1ml Buffer AP2，立即混匀
4,630×g 离心 15min 或者 8,000×g 离心 10min

沉淀蛋白



上清转移至中量制备管中，开启负压

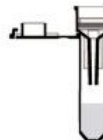
结合

保持负压
加 7ml Buffer W1A
加 8ml Buffer W2
加 4ml Buffer W2

洗涤



卸下中量管管头
12,000×g 离心 2 min



加 0.4ml Buffer TE 或者去离子水，室温静置 5min

洗脱

12,000×g 离心 2 min

