

PAXgene Blood DNA Kit (Cat#761133)

客户需要自己提供的仪器和试剂：

- PAXgene Blood DNA Tubes
- 100%异丙醇
- 70%乙醇
- 移液器和枪头
- 离心机要求：转速可达 2500 x g，摆动式转子，可以处理 50ml 的离心管。
- 能达到 65°C 的加热模块或水域槽
- 涡旋混合器

注意事项：

- 用 PAXgene Blood DNA Tubes 收集的血液样品可以在 15–25°C 下储存 14 天，2–8°C 下储存 28 天，–20°C 储存 3 个月。
- PAXgene Blood DNA Tubes 在冷冻时需要垂直用线捆好放置，或者放置在塑料袋中，不要放置在泡沫聚苯乙烯的托盘中，因为可能会引起试管炸裂。
- 如果需要长期储存样品，建议放置于–70°C，如果试管可以在–20°C 以下保存，先在–20°C 放置 24h，然后再转移至–70°C 或者–80°C。
- 可以在室温 18–25°C 下孵育 2h，解冻捆好的 PAXgene Blood DNA Tubes，或者在 37°C 水域孵育 15min 也可以，小心地翻转 PAXgene Blood DNA Tubes 10 次左右。
- 冷冻的 PAXgene Blood DNA Tubes 容易受压破损，为了降低在运输过程中的这种风险，冷冻的管子应该以玻璃制品来对待，使用者应该按照运输方法来做。

离心条件的优化：

为了获得最佳的核酸回收率，离心步骤是非常重要的。在这个操作步骤中我们使用的是 g 的离心力，如果您的离心机没有这个单位，可以按以下的计算方法换算：

$$rcf = 11.18 \times r \times (rpm/1000)^2$$

rcf 是相对离心力，r 是转子的半径，rpm 就是离心机的转速。

操作步骤：

PAXgene Blood DNA Kit 用于纯化 8.5ml（收集于 PAXgene Blood DNA Tubes (cat.no.761125)）人全血中的基因组 DNA，PAXgene Blood DNA Tubes 和 PAXgene Blood DNA Kit 是收集全血分离基因组 DNA 的一个完整的体系。

所有的离心步骤都应该在室温下进行(15–25°C)。

开始之前须知：

- 在室温 18–25°C 下孵育 2h 解冻捆好的 PAXgene Blood DNA Tubes，或者在 37°C 水域孵育 15min 也可以，小心地翻转 PAXgene Blood DNA Tubes 10 次左右。
- 步骤 8 和 17 中需要用到能加热至 65°C 的加热模块或水域槽。
- 向 PreAnalytiX Protease 冻干粉中加入 1.4ml 的 Buffer BG4（重悬 buffer），解冻后的 PreAnalytiX Protease 应该储存于 2–8°C 或者整体储存于–20°C。
- 对于每一个样品，将 5 ml Buffer BG3（消化液）和 50ul 重悬的 PreAnalytiX Protease 混匀。例如：要处理 10 个样品，混匀 50 ml Buffer BG3 和 500 µl PreAnalytiX Protease，这个混悬液应该在实验开始之前再准备。

步骤：

1、将 PAXgene Blood DNA Tube 中的血液倒入含有 25ml Buffer BG1 的处理管中。盖好管盖，为了避免把处理管的蓝色管盖弄裂，不要拧得过紧，只需要第一次感觉拧紧了就行，翻转管子 5 次混匀。

如果 PAXgene Blood DNA Tube 中的血液分成的血浆和血红细胞，需要小心地翻转管子 10 次来混匀样品。

2、2500 x g 离心 5min。

3、弃上清液，将管子置于试管架上。

有时候沉淀物很松散，在倾倒的时候需要慢一点。

4、加 5 ml Buffer BG2，盖好管盖，强力涡旋 5s 洗涤沉淀物。

5、2500 x g 离心 3min。

6、小心地弃上清液，将管子置于试管架上。

有时候沉淀物很松散，在倾倒的时候需要慢一点。

7、加入 5 ml Buffer BG3/PreAnalytiX Protease（见“开始前须知”），盖好管盖，高速涡旋 20s。

涡旋 20s 可以完全打散沉淀，涡旋时间过短，会导致沉淀重悬不完全，降低 DNA 的产量或纯度。在这一步之后，样品可以在 2–8°C 至少存放 7 天，存放之后可以从步骤 8 开始进行

8、将试管置于加热模块或者水域槽 65°C 孵育 10 min。

样品将会从浅红色变成浅绿色，这表示蛋白开始消化了。

9、高速再次涡旋 5s。

10、加入 5ml 异丙醇（100%），翻转试管至少 20 次混匀，直到出现白色的 DNA 絮状团块。

用异丙醇完全混匀对于沉淀 DNA 非常重要，而且需要仔细观察，只有紧实的 DNA 团块才能被有效地离心下来，不要涡旋，否则会降低 DNA 的产量。

11、2500 x g 离心 3min。

12、弃上清液，将试管翻转，置于干净的吸水纸上 1min。

有时候沉淀物很松散，在倾倒的时候需要慢一点。将试管翻转置吸水纸上减少异丙醇从管子的边缘倒流回沉淀中。

13、加入 5 ml 70% (v/v) 的乙醇，高速涡旋 1s。

14、2500 x g 离心 3min。

15、弃上清液，将试管翻转，置于干净的吸水纸上 1min。

有时候沉淀物很松散，在倾倒的时候需要慢一点。将试管翻转置吸水纸上减少乙醇从管子的边缘倒流回沉淀中。

16、小心地用吸水纸去除沉淀边缘的乙醇，继续倒置 5min 以干燥 DNA 沉淀。

避免沉淀过度干燥，否则 DNA 会很难溶解。

17、加 1 ml Buffer BG4，65°C 加热模块或者水域 1h 孵育溶解 DNA，接下来室温孵育过夜。

高浓度，高分子量的 gDNA 样品在 65°C 加热模块或者水域 1h 孵育后并不能完全溶解，因此建议室温孵育过夜。