

## HiPure Tissue DNA Mini Kit

### 组织 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从 1~20mg 动物组织和小于  $5 \times 10^6$  培养细胞样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30~60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

### 产品组份

产品编号	D3121-01	D3121-02	D3121-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ATL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer DL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GW1	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2	6 ml	20 ml	50 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	2 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml

Buffer AE 成分：10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

### 保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K/RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月)建议放置于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K/RNase A 需保存于-20~8℃。

## 准备事项

- 55°C 和 70°C 水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 颠倒混匀让蛋白酶充分溶解。溶解 Proteinase K 须保存于-20~8°C。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 溶解, 溶解的 RNase A 须保存于-20~8°C。
- Buffer GW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

### A. 动物组织的消化裂解(1~20mg)

1. 把 1~30mg 组织(或<10mg 肝脏、肺或脾脏)剪成尽量小的碎片, 转移至 1.5ml 离心管中。加入 230 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K, 55°C 振荡温浴 0.5~3 小时或过夜直至样品充分消化, 期间颠倒混匀几次或振荡温浴。

正确的组织量才能获得理想结果。过多的样品会降低产量和纯度。脾脏、肝脏、肾脏等样品富含 DNA, 不要超过 10mg, 肌肉和皮肤样品可达 30mg。处理 DNA 含量低的组织, 可扩大组织至 20~50mg, 按比例增加 Buffer ATL, Buffer DL 和无水乙醇的用量, 在第 6 步分次上柱。

把组织块尽量剪切成小碎片可缩短消化时间。液氮研磨, 机械匀浆器, 玻璃匀浆器, 珠磨仪处理组织样品可达到缩短消化时间的目的。消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。一般组织样品需 0.5~3 小时, 老鼠尾巴需 6~8 小时。过夜消化没有负面影响。

2. 加入 10 $\mu$ l RNase A 至消化液中, 颠倒混匀, 室温放置 10~20 分钟。  
RNA 消化时间取决于样品类型。肝脏和肾脏富含 RNA, 需较长的消化时间 20~30 分钟。
3. 加入 250 $\mu$ l Buffer DL, 涡旋 10 秒, 70°C 水浴 10 分钟。按第 4 步进行操作。  
若消化液存在明显的颗粒物或杂质, 12,000  $\times$  g 离心 5 分钟去除未消化杂质, 转移上清至新的 1.5ml 离心管中, 按第 5 步进行操作。

### B. 培养细胞的消化裂解(不超过 $5 \times 10^6$ )

1. 计算细胞数量, 于 500  $\times$  g 离心 10 分钟收集细胞, 倒弃培养液, 加入 150 $\mu$ l Buffer PBS, 涡旋重悬细胞。

2. 加入 100 $\mu$ l Buffer ATL 和 10 $\mu$ l RNase A, 混匀, 静置 10~15 分钟消化 RNA。
3. 加入 250 $\mu$ l Buffer DL, 高速涡旋 10 秒, 70 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟, 按第 4 步进行操作。

### C. 液体样品(抗凝血液、血水、重悬液等)

1. 在 1.5ml 离心管中, 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 250 $\mu$ l 全血或体液等样品, 混匀。
2. 加入 250 $\mu$ l Buffer DL 至样品中, 涡旋混匀 10 秒。
3. 70 $^{\circ}$ C 振荡(1200~1400rpm)温育 10 分钟, 按第 4 步进行操作。

### 过柱纯化

4. **加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中, 涡旋混匀 10 秒。**  
处理肝脏或脾脏等, 加入乙醇时会有沉淀形成, 属正常现象, 用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。
5. **把 HiPure gDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中, 转移第 4 步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**  
若柱子出现堵塞, 14,000  $\times$  g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 $\mu$ l, 分次过柱。
6. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**  
Buffer GW1 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
7. **倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW2 至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**  
Buffer GW2 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. **倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300 $\mu$ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。**  
取出柱子时不要颠倒或侧转, 不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体, 倒弃废液后, 把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
9. **将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 50~100 $\mu$ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**
10. **把洗脱液或 50~100 $\mu$ l 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer AE 加到柱子的膜中央, 放置 3 分钟。120,000  $\times$  g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。**

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品量。富含核酸样品如肝脏、脾脏、肺脏，用量不要超过 10mg。
- **样品消化不充分**：用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **样品裂解不充分**：样品与 Buffer DL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer DL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质**：若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 12,000 × g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分**：延长消化时间让样品充分消化，用玻璃匀浆器对样品进行匀浆。
- 样品中 DNA 含量低，用富含核酸的肝脏/脾脏来提取。
- Buffer GW1/GW2 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分**：洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。

### 3. DNA 纯度不达标

- **样品裂解不充分**：样品与 Buffer DL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer DL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀。
- **样品用量太多**：减少样品用量。
- **复杂样品**：对于一些富含代谢物质的组织，样品经 Buffer ATL/Proteinase K 消化后，用等体积的酚氯仿抽提后，再继续操作。

### 4. RNA 污染

- **样品富含 RNA**：肝脏、肾脏，培养细胞富含 RNA，延长 RNase A 消化时间至 30 分钟。