

目 录

| | |
|-----------------------|----|
| 简 介 | 2 |
| 原 理 | 2 |
| 试剂盒组成 | 3 |
| 保质期 | 3 |
| 准备工作 | 4 |
| 方案 1:微量血液或体液样品 DNA 提取 | 5 |
| 方案 2:微量动物组织 DNA 提取 | 6 |
| 方案 3:组织激光切片的 DNA 提取 | 7 |
| 方案 4:干燥血斑 DNA 提取 | 8 |
| 方案 5:拭子 DNA 提取 | 9 |
| 方案 6:石蜡组织 DNA 提取 | 10 |
| 方案 7:尿液 DNA 提取 | 11 |
| 常见问题回答 | 12 |

版本: 2024-01

简介

HiPure Tissue DNA Micro Kit 是专门为微量样品的总 DNA 提取而设计。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。试剂盒可处理 1-100 μ l 微量抗凝血液，小于 10mg 动物组织，血斑，拭子，以及各种法医样品中提取总 DNA，包括基因组 DNA，线粒体 DNA 以及病毒 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR，病毒检测等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如灭菌水)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Tissue DNA Micro Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、病毒检测等实验。

组 成

HiPure Tissue DNA Micro Kit

| 产品编号 | D3125-01 | D3125-02 | D3125-03 |
|---------------------------|----------|----------|------------|
| 纯化次数 | 10 次 | 50 次 | 250 次 |
| HiPure DNA Mini Columns I | 10 | 50 | 250 |
| 2ml Collection Tubes | 10 | 50 | 250 |
| Buffer ATL | 6 ml | 20 ml | 100 ml |
| Buffer AL | 6 ml | 20 ml | 100 ml |
| Buffer GW1 * | 6.6 ml | 13 ml | 66 ml |
| Buffer GW2 * | 6 ml | 20 ml | 2 x 50 ml |
| Carrier RNA | 120 µg | 310 µg | 3 x 310 µg |
| Protease Dissolve Buffer | 1.8 ml | 1.8 ml | 5 ml |
| Proteinase K | 6 mg | 12 mg | 2 x 30 mg |
| Buffer AE | 7 ml | 10 ml | 20 ml |
| 说明书 | 1 | 1 | 1 |

保 质 期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K/Carrier RNA 干粉室温运输和保存，收到产品后，建议保存于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K/Carrier RNA 需保存于-20~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96~100%)
- 无 DNase 酶的 1.5ml 离心管和无 DNase 酶的枪头
- (可选) 一管 25mg/ml RNase A 溶液
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 55°C 和 65°C 的水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。溶解的 Proteinase K 须保存于-20°C。
- 溶解 Carrier RNA(1 μ g/ μ l): 加入适量的 Buffer AE 至 Carrier RNA。涡旋溶解, 保存于-20°C。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。

| | |
|----------|------------------|
| D3125-01 | 加入 8.4 ml 无水乙醇 |
| D3125-02 | 加入 17 ml 无水乙醇 |
| D3125-03 | 每瓶中加入 84 ml 无水乙醇 |

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

| | |
|----------|-------------------|
| D3125-01 | 加入 24 ml 无水乙醇 |
| D3125-02 | 加入 80 ml 无水乙醇 |
| D3125-03 | 每瓶中加入 200 ml 无水乙醇 |

方案 1. 微量血液、体液、细胞 DNA 提取

该方案适合于从 1-100 μ l 抗凝血液或体液和小于 1×10^6 个细胞中提取总 DNA。

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 10 μ l Proteinase K 和 1-100 μ l 抗凝血液、唾液、血浆、血清或其它液体样品至 1.5ml 离心管，用 Buffer ATL 或灭菌水调整至 100 μ l。
2. 加入 100 μ l Buffer AL 和 3 μ l Carrier RNA 至样品中，56 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟。
3. 加入 100 μ l 无水乙醇，涡旋混匀 15 秒，室温静置 3 分钟。
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中，转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上，10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 微量动物组织/细胞 DNA 抽提

该方案适合于从小于 10mg 动物组织中提取 DNA。

1. 转移<10mg 组织样品(尽量把组织剪切成小碎片)至 1.5ml 离心管中。加入 200 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K, 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30-60 分钟。
若需要去除 RNA, 加入 2 μ l RNase A 至消化液中混匀。室温静置 10 分钟。
2. 加入 200 μ l Buffer AL 至样品中, 涡旋 10 秒混匀。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
若组织用量小于 0.1mg, 推荐再加入 3 μ l Carrier RNA 至裂解液中。
3. 加入 200 μ l 无水乙醇至样品中, 涡旋 20 秒混匀。室温静置 3 分钟。
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中, 转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

方案 3: 激光切片的 DNA 提取

该方案适合于从激光切片样品(LMT, Laser-Microdissected Tissues)中提取 DNA。

1. 加入 50 μ l Buffer ATL 至装有激光切片样品的 0.2ml 离心管中。
2. 加入 10 μ l Proteinase K 至样品中，涡旋 15 秒混匀。55 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
3. 加入 50 μ l Buffer AL 和 3 μ l Carrier RNA 至消化液中，涡旋混匀 10 秒。
4. 加入 50 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋 10 秒混匀。室温静置 3 分钟。
5. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中，转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上，10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 4: 干燥血迹 DNA 提取

该方案适合于从干燥的血液收集卡中提取 DNA。

1. 从血斑滤纸片中取 1~3 片直径为 3mm 的血斑, 并转移至 2.0ml 离心管中。加入 250 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中。55 $^{\circ}$ C 振荡(1200~1400rpm)温育 60 分钟。
2. 加入 250 μ l Buffer AL 和 4 μ l Carrier RNA。70 $^{\circ}$ C 振荡(1200~1400rpm)温育 10 分钟。
3. 13,000 \times g 离心 1 分钟, 转移全部消化液至新的离心管中。
4. 加入 200 μ l 无水乙醇至样品中。涡旋混匀 1 秒, 室温静置 3 分钟。
5. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中, 转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

方案 5: 拭子 DNA 提取

该方案适合于从拭子样品中提取 DNA。

1. 把干拭子转移至 2ml 离心管中, 加入 500 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K, 56 $^{\circ}$ C 振荡温育 1 小时。
2. 加入 500 μ l Buffer AL 和 4 μ l Carrier RNA, 70 $^{\circ}$ C 振荡温育 1 小时。
3. 加入 500 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀 10 秒。
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中, 转移一半体积混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 把余下的混和液转移至柱子中, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

方案 6: 石蜡切片 DNA 提取

该方案适合于从石蜡切片、或石蜡固定组织样品中提取高纯度的 DNA。

1. 把石蜡样品切成 5-10 μ m 薄片, 转移 1~3 卷切片至 1.5ml 离心管中。加入 1ml 二甲苯 55 $^{\circ}$ C 温育 3 分钟, 涡旋混匀 10 秒让石蜡充分溶解。14,000 \times g 离心 3 分钟, 小心吸弃全部液体, 不要吸到组织碎片。
2. 加入 1ml 100% 乙醇, 涡旋混匀 15 秒。14,000 \times g 离心 3 分钟, 小心吸弃上清液, 打开管盖, 37 $^{\circ}$ C 干燥 10~15 分钟彻底去除乙醇。
3. 加入 250 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K, 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 1 小时, 90 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时;
4. 加入 10 μ l Proteinase K 至样品中, 55 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。
5. 加入 250 μ l Buffer AL 和 4 μ l Carrier RNA, 涡旋混匀 5 秒。
6. 加入 250 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀 5 秒。
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中, 转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 10,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 \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。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟, 10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 转移洗脱液或 30 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

方案 7: 尿液 DNA 提取

该方案适合于从 10-50ml 尿液中提取高纯度的 DNA。

1. 转移 10~50ml 尿液样品至合适的离心管中, 3,000 × g 离心 10 分钟收集脱落细胞。
2. 倒弃上清液, 加入 500µl Buffer PBS 或生理盐水, 涡旋 5 秒。
3. 3,000 × g 离心 10 分钟收集脱落细胞, 倒弃上清液, 短暂离心后吸弃残液。
4. 加入 250µl Buffer ATL、10µl Proteinase K 和 3µl 1M DTT, 56°C 振荡温育 30 分钟。
5. 加入 250µl Buffer AL 和 4µl Carrier RNA, 涡旋 10 秒, 70°C 温育 10 分钟。
6. 加入 250µl 无水乙醇, 涡旋 10 秒, 室温静置 3 分钟。
7. 把 HiPure DNA Mini Column I 柱装在 2ml 收集管中, 转移全部混合液至柱子中。10,000 × g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上, 10,000 × g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中, 加入 500µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 10,000 × g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300µl Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × 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。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入 30µl 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟, 10,000 × g 离心 1 分钟。
12. 转移洗脱液或 30µl 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于 2~8°C, 长期保存需放置于-20°C 或-80°C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

| 现象 | 原因及解决方法 |
|------------------------------|---|
| DNA 产量低 | |
| 样品 DNA 含量低 | 组织样品本身含量低 |
| 柱子堵塞 | 若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 xg 离心 5 分钟去除未消化的物质。 |
| 洗脱液体积不够或洗脱液没有加到膜上 | 增加洗脱体积和洗脱次数。洗脱液必须全部加到柱子的膜中央。 |
| Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够 | 按说明书或瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。 |
| 柱子没有空甩 | 柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。 |
| RNA 污染 | |
| 加入 RNASE 消化 | 样品经 Buffer ATL 或 Buffer AL 消化后，加入 RNase A 消化去除 RNA |
| OD260/OD280 比值不正常 | |
| RNA 污染 | 加入 RNASE 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间 |
| Proteinase K 活性下降 | 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于 -20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。 |
| 加入 Buffer AL 后混匀不充分 | 重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。 |
| Buffer DW2 中乙醇没有加入或加入量不够 | 按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。 |