

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	3
方案 1:微量细胞和组织 DNA 提取	4
方案 2:组织激光切片的 DNA 提取	5
方案 3:切片组织 DNA 提取	6
方案 4:干血片 DNA 提取	7
常见问题回答	8

版本: 2018-01

## 简介

HiPure DNA Nano Kit 是专门为超微量细胞( $1-10^4$ )、激光组织切片、石蜡切片、穿刺组织和 1 个干血片的总 DNA 提取而设计。本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  $1-10^4$  个培养细胞、 $<10\mu\text{l}$  微量抗凝血液,  $<1\text{mg}$  动物组织, 血斑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 Buffer TE)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 DNA Nano 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 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。

## 保质期

本产品室温( $15\sim 25^\circ\text{C}$ )可保存 18 个月。Protease Mixture 干粉室温运输和保存,收到产品后建议放置于 $-20\sim 8^\circ\text{C}$ 。溶解后的 Proteinase K 需保存于 $-20\sim 8^\circ\text{C}$ 。低温下, Buffer ATL 可能会有沉淀形成,需  $37^\circ\text{C}$  水浴让沉淀完全溶解。Protease Mixture 室温运输和保存,收到试剂盒后请保存于 $-20\sim 8^\circ\text{C}$ 。

## 组成

### HiPure DNA Nano Kit

产品编号	D3120-01	D3120-02	D3120-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Nano Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes A	10	50	250
Buffer ATL	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer AL	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Protease Mixture	12 mg	12 mg	60 mg
Buffer AE	1.8 ml	5 ml	15 ml
说明书	1	1	1

### 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
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 55℃ 水浴锅
- 溶解 Protease Mixture(20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Protease Mixture 至终浓度为 20mg/ml。溶解的须分装保存于-20℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3120-01	加入 24 ml 无水乙醇
D3120-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3120-03	加入 200 ml 无水乙醇

## 方案 1. 微量血液、培养细胞和体液 DNA 提取

该方案适合从小于 10 $\mu$ l 抗凝血液或体液样品、以及 1-10<sup>4</sup> 个培养细胞中提取总 DNA。

### 微量血液、培养细胞

1. 转移 <10 $\mu$ l 抗凝血液、唾液或 1-10<sup>4</sup> 个细胞重悬液至 0.5ml 离心管中。
2. 加入 10 $\mu$ l Protease Mixture 和 40 $\mu$ l Buffer ATL 至样品中。涡旋混匀 15 秒。
3. 56 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。短暂离心收集管壁上的液滴。
4. 加入 60 $\mu$ l Buffer AL 和 60 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 15 秒混匀，室温静置 3 分钟。短暂离心收集管壁上的液滴。按第 5 步进行操作。

### 无细胞体液样品

1. 转移 50 $\mu$ l 血清、血浆等液体样品转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 10 $\mu$ l Protease Mixture 和 60 $\mu$ l Buffer AL 至样品中。涡旋 15 秒混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。
3. 加入 60 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 15 秒混匀，室温静置 3 分钟。
4. 短暂离心收集管壁上的液滴。按第 5 步进行操作。
5. 把 DNA 痕量柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。** 6,000  $\times$  g 离心 30 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中，** 6,000  $\times$  g 离心 30 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 6,000  $\times$  g 离心 30 秒。  
Buffer GW2 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
9. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 5~15 $\mu$ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。** 静置 3 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

## 方案 2: 激光切片的 DNA 提取

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

1. 加入 40 $\mu$ l Buffer ATL 至装有激光切片样品的 0.2ml 离心管中。
2. 加入 10 $\mu$ l Protease Mixture 至样品中。涡旋 15 秒混匀。
3. 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 10~30 分钟。
4. 短暂离心收集管壁上的液滴。
5. 加入 50 $\mu$ l Buffer AL 和 50 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 15 秒混匀，室温静置 3 分钟。
6. 短暂离心收集管壁上的液滴。
7. 把 DNA 痕量柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。**6,000  $\times$  g 离心 30 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000  $\times$  g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000  $\times$  g 离心 30 秒。  
Buffer GW2 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质，这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 5~15 $\mu$ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

### 方案 3: 石蜡切片 DNA 提取

该方案适合于从微量的石蜡切片样品中提取高纯度的 DNA。

1. 转移 1 个切片至 1.5ml 离心管中,加入 0.5ml 二甲苯并剧烈涡旋 30 秒。14,000 × g 离心 3 分钟。小心吸弃上清液。
2. 加入 0.5ml 无水乙醇, 涡旋 30 秒。
3. 14,000 × g 离心 3 分钟。小心彻底吸弃上清液。
4. 打开管盖, 37°C 干燥 10~15 分钟去除乙醇。
5. **加入 50µl Buffer ATL 和 10µl Protease Mixture 至样品中, 涡旋 15 秒混匀。55°C 水浴 1 小时。**
6. 90°C 水浴 1 小时, 短暂离心收集管壁上的液滴。
7. **加入 60µl Buffer AL 和 60µl 无水乙醇至样品中。** 涡旋 15 秒混匀, 室温静置 3 分钟。短暂离心收集管壁上的液滴。
8. 把 HiPure DNA Nano Column 装在收集管中。**转移混合液至柱子中。** 6,000 × g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中,** 6,000 × g 离心 30 秒。
10. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中,** 6,000 × g 离心 30 秒。  
Buffer GW2 使用之前, 须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
11. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质, 这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
12. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 5~10µl 预热至 56°C Buffer AE 至柱子的膜中央。** 静置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存-20°C 或-80°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. 从干燥血斑滤纸片中取 1 块直径为 3mm 的血斑, 并转移至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 100 $\mu$ l Buffer ATL 和 10 $\mu$ l Protease Mixture 至样品中。**涡旋混匀。
3. 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30 分钟。
4. **加入 100 $\mu$ l Buffer AL 至样品中,** 70 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。
5. 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟, 转移全部消化液至新的离心管中。
6. **加入 100 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。**涡旋 15 秒混匀。室温静置 3 分钟。
7. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。** 6,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中,** 6,000  $\times$  g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中,** 6,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。  
Buffer GW2 使用之前, 须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
10. 倒弃流出液, 把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 5-15 $\mu$ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ 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 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
<b>DNA 产量低</b>	
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了的膜中央。
Buffer 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 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。
<b>RNA 污染</b>	
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
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
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。