

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 5×10^6 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

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℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

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。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8°C。
- 溶解 RNase A (1.5mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 1.5mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下保存, 但溶解的 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 1~20mg 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 220 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K, 涡旋混匀。55°C 温浴 1~3 小时或过夜消化, 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。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。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。
2. **加入 10 μ l RNase A 至消化液中, 颠倒混匀, 室温放置 10 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(15 分钟)。
3. **加入 250 μ l Buffer DL 至消化液中, 高速涡旋 10 秒。70°C 水浴 10 分钟。**
4. (可选: 有未消化物质)12,000 \times g 离心 3 分钟, 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 5×10^6)

1. 计算细胞数量。 $2,000 \times g$ 离心 5 分钟收集细胞，小心倒弃或吸弃培养液。
2. 加入 220 μ l Buffer PBS, 10 μ l RNase A 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。涡旋 10 秒重悬细胞。室温静置 10 分钟。
3. 加入 250 μ l Buffer DL 至细胞重悬液中，涡旋混匀 15 秒。 65°C 水浴 15 分钟。按第 5 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 μ l Proteinase K。
2. 加入 250 μ l 唾液、牛奶、抗凝血液、血水等样品，涡旋 5 秒。
3. 加入 250 μ l Buffer DL 至样品中，涡旋混匀 15 秒。 65°C 水浴 15 分钟。
4. 按第 5 步进行操作。

过柱纯化

5. 加入 250 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 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。
6. 把 HiPure gDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移第五步获得的混合液(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 μ l，分次过柱。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1 至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μ l Buffer GW2 至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。 $12,000 \times g$ 离心 2 分钟。
10. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
11. 再加入 30~100 μ l 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。

12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需放置于-20℃。

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，用等倍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。