

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: 2010-01

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	5 ml	15 ml	60 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. 转移 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。

处理细胞样品时，5,000 \times g 离心 3 分钟收集细胞，小心吸弃液体，余下~100 μ l 的溶液，涡旋打散细胞。
2. **加入 10 μ l Proteinase K 和 100 μ l Buffer AL 至样品中。** 涡旋 15 秒混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。

若血液小于 10 μ l 或样品中核酸含量很低，推荐加入 3 μ l Carrier RNA 至样品中。
3. **加入 100 μ l 无水乙醇，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。
5. 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。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。** 6,000 \times g 离心 30~60 秒。

Buffer GW1 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ 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。
8. (可选)倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 6,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50 μ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。** 静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。

DNA 微量柱最小洗脱体积是 15 μ l。小于 15 μ l 会导致 DNA 的洗脱效率下降。第一次可洗脱出 50~70% DNA。若需最高产量，可加入 15~50 μ l Buffer AE 至柱子的膜中央，进行第二次洗脱。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-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。
2. **加入 190 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K**，涡旋 10 秒混匀。短暂离心让组织块浸泡到裂解液中。
3. 55 $^{\circ}$ C 水浴 1~3 小时或直至样品完全消化，水浴期间偶尔混匀几次。
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。
4. **加入 200 μ l Buffer AL 至样品中**，涡旋 20 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。
5. **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。
6. 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。
7. 倒弃滤液并把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer GW1**(已用乙醇稀释)至柱子，6,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，6,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. (可选)倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，6,000 \times g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。12,000 \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 15-50 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央**。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。

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 40 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。
3. 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时, 水浴其间需偶尔涡旋混匀。
4. **加入 50 μ l Buffer AL 和 3 μ l Carrier RNA 至消化液中, 涡旋 15 秒混匀。**
5. **加入 50 μ l 无水乙醇至消化液中, 涡旋 15 秒混匀。室温静置 3 分钟。**
6. 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。**
7. 倒弃流出液, 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, 6,000 \times g 离心 30~60 秒。**
Buffer GW1 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, 把柱子装回收集管中。**加入 600 μ 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。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~50 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。**
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于-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. 从干燥血斑滤纸片中取 3~5 块直径为 3mm 的血斑，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 200 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中。**涡旋混匀。
3. 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30~60 分钟。
4. **加入 200 μ l Buffer AL 至样品中。**最高速度涡旋 20 秒混匀。70 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。
注：若从 1 个 3mm 血斑中提取 DNA，推荐再加入 2 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)至样品中。
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 200 μ 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. 倒弃流出液，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，6,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer GW1 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μ 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。12,000 \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 15-30 μ 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。

方案 5: 拭子 DNA 提取

该方案适合于从拭子样品中提取 DNA。

1. 把一个拭子转移至 2ml 离心管中。加入 400 μ l (棉签或 DacRoN 拭子)或 600 μ l (Omni 拭子) Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K, 涡旋混匀。
2. 56 $^{\circ}$ C 振荡温育 1 小时。
3. 加入 400 μ l (棉签或 DacRoN 拭子)或 600 μ l (Omni 拭子) Buffer AL, 涡旋 15 秒混匀。
4. 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
5. 加入 400 μ l (棉签或 DacRoN 拭子)或 600 μ l 异丙醇, 涡旋 15 秒混匀。
6. 把 DNA 柱装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。若混合液体积超过 700 μ l, 可分多次上柱。
7. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer GW1 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。加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 8,000 \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。
9. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。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。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 20-50 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于-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. **用干净刀片去除多余石蜡。把样品(<10mg)切成小碎片。**
把石蜡样品切成 5-10 μ m 薄片, 有利于下一步的消化。
2. **立即转移小碎片或切片至 1.5ml 离心管中; 加入 1ml 二甲苯并剧烈涡旋 30 秒。**
14,000 \times g 离心 2 分钟。小心吸弃上清液;
3. **加入 1ml 100% 乙醇, 涡旋 30 秒。** 14,000 \times g 离心 2 分钟。小心彻底吸弃上清液;
4. 打开管盖, 37 $^{\circ}$ C 干燥 10~15 分钟去除乙醇。
5. **加入 190 μ l Buffer ATL 和 10 μ l Proteinase K 至样品中, 涡旋重悬样品。** 55 $^{\circ}$ C 温育 1 小时或直至样品完全消化;
6. 90 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时;
7. 14,000 \times g 离心 2 分钟。转移上清液至 1.5ml 离心管中。
8. **加入 200 μ l Buffer AL 和 200 μ l 无水乙醇, 涡旋 30 秒混匀。**
9. 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。**
10. 倒弃流出液, 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, 6,000 \times g 离心 30~60 秒。**
11. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中, 6,000 \times g 离心 30~60 秒。**
12. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 20-50 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Buffer AE 或灭菌水至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或-80 $^{\circ}$ C。

方案 7: 尿液 DNA 提取

该方案适合于从 1-30ml 尿液中提取高纯度的 DNA。

1. **转移 1ml 尿液至 1.5ml 离心管中。6,000 × g 离心 3 分钟收集细胞。**
该方案可处理高达 30ml 的尿液。把 <30ml 尿液转移至 50ml 离心管。3,000 × g 离心 10 分钟收集细胞，
2. 倒弃上清液，加入 500µl Buffer AE。涡旋 5 秒。
3. **6,000 × g 离心 3 分钟收集细胞。**小心吸弃所有的上清液。
4. **加入 200µl Buffer ATL、10µl Proteinase K 和 5µl 1M DTT，涡旋 20 秒混匀。**56℃ 水浴 1 小时。
5. **加入 200µl Buffer AL 和 4µl Carrier RNA 至样品中。**涡旋 20 秒混匀。70℃ 温育 10 分钟。
6. **加入 200µl 无水乙醇至样品中，**涡旋 20 秒混匀。室温静置 3 分钟。
7. 把 DNA 柱装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**6,000 × g 离心 30~60 秒。若混合液体积超过 700 µl，可分多次上柱。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500µl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**6,000 × g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 650µl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000 × g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。12,000 × 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。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 20~50µl 预热至 55℃ Buffer AE 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20℃或-80℃。

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了的膜中央。
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。