

## 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( $15-25^\circ\text{C}$ )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 $-20-8^\circ\text{C}$ 。溶解后的 Proteinase K 需保存于 $-20-8^\circ\text{C}$ 。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 $-20-8^\circ\text{C}$ 。

## 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	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%)
- 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 5 秒。56 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟，短暂离心收集管壁上的液滴。
3. 加入 60 $\mu$ l Buffer AL 和 60 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 10 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。混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
3. 加入 60 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 5 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。8,000  $\times$  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，8,000  $\times$  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 10~15 $\mu$ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。静置 5 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, 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 10~30 分钟。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。
4. 加入 50 $\mu$ l Buffer AL 和 50 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 5 秒混匀, 室温静置 3 分钟。
5. 短暂离心收集管壁上的液滴。
6. 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。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 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 10 秒。14,000 × g 离心 3 分钟。小心彻底吸弃上清液。
3. 打开管盖, 37°C 干燥 10~15 分钟去除乙醇。
4. **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。**
5. 90°C 水浴 1 小时, 短暂离心收集管壁上的液滴。
6. **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。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 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。
12. 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 150 $\mu$ l Buffer ATL 和 10 $\mu$ l Protease Mixture，55 $^{\circ}$ C 振荡温育 30 分钟。
3. 加入 150 $\mu$ l Buffer AL 至样品中，70 $^{\circ}$ C 振荡温育 10 分钟。
4. 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟，转移全部消化液至新的离心管中。
5. 加入 150 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。涡旋 5 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，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。
8. 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。
9. 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。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 10-15 $\mu$ 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。
11. 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子的膜中央。
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。