

HiPure Mollusc DNA Kit

软体动物组织 DNA 抽提试剂盒

本产品适合于从 1~50mg 水生生物、软体动物、低等生物的组织样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，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	D3128-01	D3128-02	D3128-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer MTL	5 ml	15 ml	90 ml
Buffer GXP	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer DL	5 ml	15 ml	90 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2 *	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase A	5 mg	10 mg	45 mg
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 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 MTL 可能会有沉淀形成,需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 55℃和 70℃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, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 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℃。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8℃。
- 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: 简易样品

1. 将 10~50mg 动物组织处理成尽量小的碎片, 转移至 1.5ml 离心管, 加入 250 μ l Buffer MTL 和 20 μ l Proteinase K 混匀, 55℃振荡温浴 1~3 小时或过夜。

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 15mg, 肌肉类样品可达 50mg。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, 过夜消化没有负面影响。推荐采用恒温振荡金属浴, 500-800rpm 振荡温育可以加速消化速度。采用水浴锅温育时, 温育期间每隔 20-30 分钟颠倒混匀数次有利于加速消化速度。

处理乙醇浸泡保存的样品, 去除乙醇保存液, 加入 1ml Buffer PBS 或生理盐水浸泡去除乙醇, 然后去除液体。

2. 加入 10 μ l RNase A 至消化液中，混匀，室温静置 10~15 分钟。
3. 14,000 \times g 离心 3 分钟，转移 250 μ l 上清液至新的 1.5ml 离心管中。
4. 加入 250 μ l Buffer DL，涡旋 5 秒，70 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。
5. 加入 250 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋 5~10 秒。
处理富含 DNA 的组织时，加入乙醇会有沉淀形成，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。转移全部混合液(包括沉淀)至柱子中。
12,000 \times g 离心 1 分钟。
若柱子出现堵塞，13,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已加乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW1 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已加乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已加乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心 2 分钟。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ 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. 转移洗脱液或 30-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C。

B. 复杂组织样品(富含脂类、多糖类、色素类组织样品):

该方案适合处理复杂的组织样品(富含脂类、色素和多糖类样品), 如鱼尾, 低等动物组织样品, 肠道内容物、脂肪组织、含糖内脏团, 富含色素的组织样品等。

1. 将不超过 30mg 组织处理成尽量小的碎片, 转移至 1.5ml 离心管, 加入 250 μ l Buffer MTL 和 20 μ l Proteinase K 混匀, 55 $^{\circ}$ C 振荡温浴 1~3 小时或过夜。
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。
2. 加入 10 μ l RNase A 至消化液中, 颠倒混匀, 室温静置 10 分钟。
3. 加入 500 μ l Buffer GXP 至样品中, 涡旋 5-10 秒, 13,000 \times g 离心 5 分钟。
4. 把 HiPure gDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移全部上清液至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已加乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW1 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已加乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
Buffer GW2 在使用之前, 必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2(已加乙醇稀释)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。12,000 \times g 离心 2 分钟。
9. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中, 加入 30~100 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ 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。
10. 转移洗脱液或 30-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C。