

## HiPure Blood DNA Mini Kit

### 血液 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从小于 250 $\mu$ l 抗凝血液，血清，血浆、牛奶、唾液、或其它液体样品中快速提取总 DNA。试剂盒对全血或液体样品直接裂解和消化，纯化的 DNA 包括基因组 DNA，线粒体 DNA，病毒 DNA(如乙肝)，或其它寄生微生物的 DNA。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	D3111-01	D3111-02	D3111-03	D3111-04
纯化次数	20 次	50 次	250 次	500 次
HiPure gDNA Mini Columns	20	50	250	2 x 250
2ml Collection Tubes	40	100	5 x 100	10 x 100
Buffer AL	6 ml	15 ml	90 ml	150 ml
Buffer DW1	12 ml	30 ml	150 ml	280 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml	2 x 100 ml
Proteinase K	12 mg	30 mg	140 mg	280 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

### 保存条件

本产品室温(15~25 $^{\circ}$ C)可保存 18 个月。Proteinase K 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月) 建议保存于-20~8 $^{\circ}$ C。溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer AL 可能会有沉淀形成，需 55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 70°C水浴锅或振荡金属浴
- 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°C。
- Buffer DW2 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

1. 在 1.5-2.0ml 离心管中, 加入 25 $\mu$ l Proteinase K。
2. **转移 10~250 $\mu$ l 抗凝血, 白膜层, 血清, 血浆, 牛奶, 唾液, 或其它液体样品至装有蛋白酶的离心管中。振荡混匀 5 秒。**若样品<250 $\mu$ l, 用 Buffer PBS 或 Buffer AE 调整总体积至 250 $\mu$ l。

处理凝固血液样品时, 先用机械或玻璃匀浆器匀浆样品使之充分液化后再提取。

由于鸟类, 鱼类等非哺乳类动物血液红细胞是带核, DNA 含量极为丰富。一次只能处理 5-20 $\mu$ l 血液。处理培养细胞时(不超过  $5 \times 10^6$ ): 400  $\times$  g 离心 5 分钟收集细胞。弃培养液, 加入 250 $\mu$ l PBS Buffer 涡旋重悬细胞, 然后按第三步进行操作。

处理 DNA 含量低的样品, 样品量可达到 600 $\mu$ l, 按比例扩大 Buffer AL, Proteinase K 和无水乙醇的用量, 第 6 步操作时, 反复过三次柱子。

3. **加入 250 $\mu$ l Buffer AL 至样品中。**颠倒 3~5 次, 高速涡旋混匀 15 秒。70°C 水浴 10 分钟。

Buffer AL 非常粘稠, 转移时先在 Buffer AL 溶液中吸打几次润湿枪头以确保转移溶液的准确性。若需去除 RNA, 加入 10 $\mu$ l RNase A 至裂解液中, 室温静置 10 分钟。

4. **加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至样品中,** 高速涡旋 15 秒。
5. 短暂离心收集管壁的液滴。
6. 把 gDNA 柱装在新的收集管中。**转移混合液至柱子中。** 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。丢弃收集管和流出液。
7. **把 gDNA 柱装在新的收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer DW1 至柱子上。** 颠倒混匀 2 次。

10,000 × g 离心 30~60 秒。

8. **倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer DW2 至柱子中，10,000 × g 离心 30~60 秒。**

Buffer DW2 使用前，须用无水乙醇进行稀释。处理 DNA 含量低的样品时，重复用 650µl Buffer DW2 洗涤柱子一次。

9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。

10. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中(自配)，加入 30~150µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。**

若需获得最高产量，可再加入 30~100µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。处理 DNA 含量很低的样品，如血清、血浆、尿液、鼻涕等无需第二次洗脱。

11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需放置于-20°C。

### **附加方案：从 0.5~1ml 的抗凝血液中抽提高产量 DNA**

1. **转移 500~1000µl 抗凝血液至 5~15ml 离心管中，加入 5 倍体积灭菌水至样品中。颠倒混匀 5~10 次，静置 5 分钟。**
2. 2,000 × g 离心 5 分钟收集白细胞。小心倒弃上清液，并反扣于吸水纸上吸尽残液。
3. **加入 250µl 灭菌水和 25µl 蛋白酶 K 至沉淀团中，涡旋 15 秒打散沉淀。**
4. **加入 250µl Buffer AL 至样品中，高速涡旋混匀 15 秒。**
5. 65°C 水浴 30 分钟。按第 4~9 进行操作。
6. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中(自配)，加入 100µl 预热至 65°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。**
7. **再加入 100µl 预热至 65°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。**
8. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需放置于-20°C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer AL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
- **Proteinase K 活性下降:** 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于  $-20\sim-8^{\circ}\text{C}$ 。Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。
- **样品含凝血块:** 处理陈旧的血液样品时，加大蛋白酶的用量，或用附加方案进行提取。
- **样品含固体颗粒:** 在第四步加入乙醇前， $10,000 \times g$  离心 3 分钟去除未消化的杂质，转移上清液至新的离心管后再加入乙醇。
- **样品用量太多:** 白膜层、浓缩血液、细胞悬液中含大量的细胞，减少样品量。

### 2. DNA 纯度不达标

- 参考柱子堵塞部分。
- **血液样品中存在凝血块:** 加大蛋白酶 K 的用量，消化过程中用移液枪吸打几次打散凝块。或通过离心去除。处理凝血较多的样品时，需用匀浆器充分匀浆凝块。
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer AL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
- 对于灵敏的运用，用 Buffer DW2 清洗两次。

### 3. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- 血浆或血清等无细胞体液样品，其 DNA 含量低，通常只有纳克级。
- Buffer DW2 未加入乙醇稀释。
- 第四步加入乙醇后混匀不充分或乙醇加入的体积不够。
- 洗脱不充分：洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。