

目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
方案 1:组织和细胞 DNA 中量抽提	5
方案 2:组织和细胞 DNA 大量抽提	7
常见问题回答	9

版本: 2019-01

简介

HiPure Tissue DNA Midi/Maxi Kits 为动物组织和培养细胞 DNA 中大量提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。HiPure Tissue DNA Midi Kit 试剂盒适合于从小于 200mg 动物组织样品中提取高达 0.5mg DNA。HiPure Tissue DNA Maxi Kit 试剂盒适合于从小于 1g 动物组织样品中提取高达 2.5mg DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern blot, 酶切等实验。

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 Tissue DNA Midi/Maxi Kits 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。一步可选的酚氯仿抽提可高效地去除多糖类和脂类物质，得到上清液加入乙醇后，转移至柱子过滤，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(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、酶切等实验。

保质期

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。

组 成

HiPure Tissue DNA Midi Kit

产品编号	D3122-01	D3122-02	D3122-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Midi Columns	2	10	50
15ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer ATL	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer DL	10 ml	50 ml	200 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	120 ml
说明书	1	1	1

HiPure Tissue DNA Maxi Kit

产品编号	D3123-01	D3123-02	D3123-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
HiPure gDNA Maxi Columns	2	10	50
50ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer ATL	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer DL	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer GW1 *	13 ml	66 ml	2 x 132 ml
Buffer GW2 *	20 ml	2 x 50 ml	3 x 100 ml
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Proteinase K	12 mg	50 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer AE	15 ml	30 ml	200 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 酚氯仿(1:1)或酚氯仿异戊醇(25:24:1)
- 55℃和70℃的水浴锅
- (可选)37℃的水浴锅
- (可选)Buffer TE
- 组织匀浆工具
- 溶解 Proteinase K(20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至装有 Proteinase K 的瓶子中, 至终浓度为 20mg/ml。轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。分装保存于-20℃。
- 溶解 RNase A(15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至装有 RNase A 的瓶子中, 至终浓度为 15mg/ml。轻轻颠倒让 RNase A 充分溶解, 保存于-20℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。

D3122-01	加入 8.4 ml 无水乙醇
D3122-02	加入 17 ml 无水乙醇
D3122-03	加入 84 ml 无水乙醇
D3123-01	加入 17 ml 无水乙醇
D3123-02	加入 84 ml 无水乙醇
D3123-03	每瓶加入 168 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3122-01	加入 24 ml 无水乙醇
D3122-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3122-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇
D3123-01	加入 80ml 无水乙醇
D3123-02	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇
D3123-03	每瓶中加入 400 ml 无水乙醇

方案 1. 组织和细胞 DNA 中量提取

该方案适合于从 $\leq 200\text{mg}$ 动物组织或 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞样品中提取高达 0.5mg 高纯度的基因组 DNA，以下离心操作都在室温进行。

动物组织

1. 用液氮将 200mg 组织样品(或 100mg 肝脏)研磨成粉末状,并转移至 15ml 离心管中。**加入 3.0ml Buffer ATL 和 100 μ l Proteinase K, 颠倒混匀。**55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 小时或至样品完全消化。水浴期间需每隔 20 分钟颠倒混匀一次,或放置于振荡水浴锅中进行消化。

正确使用组织用量才能获得理想结果。过量的样品会造成柱子堵塞,引起产量和纯度下降。某些组织样品,如脾脏含有丰富的 DNA,用量不要超过 50mg,处理肝脏,肾脏和肺组织时,组织量不要超过 100mg。处理 DNA 含量较低的样品如肌肉、脑、脂肪等,组织样品用量可达至 200mg。初次提取时,组织用量最好为 100mg,根据实验结果,再进行调整。推荐用液氮研磨、机械匀浆器、玻璃匀浆器对组织样品进行匀浆以缩短消化时间提高消化效果。消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。液氮研磨的样品一般只需消化 1-3 小时,样品也可以 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜消化。

2. **加入 50 μ l RNase A 至裂解液中。**颠倒混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30~60 分钟。
3. (可选)加入 3.0ml 酚氯仿(25:24)至裂解液中。颠倒混匀 30~50 次。静置 5 分钟。
注:富含多糖类样品如脑,或富含脂类的样品如脂肪,或水生生物不要省略这一步。
4. 5,000rpm 离心 15 分钟。转移 2.5ml 上清液至 15ml 离心管中。按第 5-15 步进行操作。(若上清液体积不足或超过 2.5ml,按比例加入 Buffer DL 和无水乙醇)。

培养细胞

1. 计算细胞数量。300 \times g 离心 5 分钟收集细胞(小于 5×10^6)。
2. 小心吸弃或倒弃培养液,剩余 100 μ l 溶液。剧烈涡旋让细胞在残液中充分分散。
3. **加入 2.5ml Buffer ATL 和 100 μ l Proteinase K 至细胞重悬液中。**立即涡旋混匀 30 秒;55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 小时,每隔 20 分钟混匀一次。
4. 加入 50 μ l RNase A 至裂解液中。颠倒混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 60-120 分钟。按 5-15 步进行操作。

过柱纯化

5. **加入 2.5ml Buffer DL 至裂解液中。** 涡旋混匀 20 秒。70℃水浴 10 分钟。
6. **加入 2.5ml 无水乙醇至裂解液中，** 立即以最高速度涡旋 20 秒混匀。
注：加入乙醇时可能会有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5-10 次尽量打散沉淀团。
7. 把 HiPure gDNA 中量结合柱装在 15ml 收集管中。**转移 4ml 混合液(包括沉淀)至柱子中。** 5,000rpm 离心 5 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**转移剩余混合液至柱子。** 5,000rpm 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 2ml Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子中。** 5,000rpm 离心 5 分钟。
注：Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 4ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。** 5,000rpm 离心 5 分钟。
Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。5,000rpm 离心 15 分钟以甩干柱子的基质。
12. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。**加入 300~600 μ l 预热至 70℃ Buffer AE 至柱子的膜中央。** 室温放置 3 分钟。5,000rpm 离心 3 分钟。
13. **再把洗脱液转移至柱子的膜中央，** 室温放置 3 分钟。5,000rpm 离心 3 分钟。
DNA 柱子最小洗脱体积是 300 μ l，小于 300 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 40-60% DNA。若需获得最高产量，建议进行第二次洗脱。
14. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 转移至 2ml 离心管中，并保存于 2-8℃，长期保存需保存于-20℃或-80℃。

方案 2. 组织和细胞 DNA 大量提取

该方案适合于从<1g 动物组织或培养细胞(<2 × 10⁷)样品中提取高达 2.5mg 高纯度的基因组 DNA。以下离心操作都在室温进行。

1. 用液氮将 1g 组织样品(或 200mg 脾脏, 500mg 肝脏, 肾脏, 肺)研磨成粉末, 并转移至 15ml 离心管中。**加入 12ml Buffer ATL 和 200 μ l Proteinase K, 涡旋混匀。** 55 $^{\circ}$ C 振荡温育 3 小时或至样品完全消化。

注: 正确使用组织用量, 才能获得理想结果。过量的样品会造成柱子堵塞, 而引起产量和纯度下降。某些组织样品, 如脾脏含有丰富的 DNA, 用量不要超过 200mg, 处理肝脏, 肾脏和肺组织时, 组织量不要超过 500mg。处理 DNA 含量较低的样品如肌肉、脑、脂肪等, 组织样品用量可达至 1g。初次提取时, 组织用量最好为 500mg, 根据实验结果, 再进行调整。用玻璃匀浆器对组织样品进行匀浆也可缩短消化时间, 提高消化效果。消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。一般样品只需水浴 1-3 小时, 可 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜

2. **加入 100 μ l RNase A 至裂解液中。** 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时。
3. (可选)加入 12ml 酚氯仿(25:24)至裂解液中, 颠倒混匀 30~50 次。静置 5 分钟。
注: 富含多糖类样品如脑, 或富含脂类的样品如脂肪, 或水生生物不要省略这一步。
4. 5,000rpm 离心 15 分钟。转移 10ml 上清液至 50ml 离心管中。按 5-15 步进行操作。
注: 若上清液体积不足或超过 10ml, 按比例加入 Buffer DL 和无水乙醇。

培养细胞

1. 计算细胞数量。300 × g 离心 5 分钟收集细胞(<2 × 10⁷)。
2. 小心倒弃或吸弃培养液。剩余 500 μ l 的溶液。剧烈涡旋让细胞在残液中充分重悬。
3. **加入 9.5ml Buffer ATL 和 200 μ l Proteinase K,** 立即涡旋 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时, 每隔 20 分钟涡旋一次。
4. **加入 100 μ l RNase A 至裂解液中。** 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时。按 5-15 步进行操作。

过柱纯化

5. **加入 10ml Buffer DL 至裂解液中。**涡旋 15 秒混匀。70℃水浴 10 分钟。
6. **加入 10ml 无水乙醇至裂解液中。**立即以最高速度涡旋 15 秒混匀。
注：加入乙醇时可能会有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5-10 次尽量打散沉淀团。
7. 把 HiPure DNA 大量结合柱装在 50ml 收集管中。**转移一半混合液(包括沉淀)至柱子中。** 4,000 rpm 离心 5 分钟。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**转移剩余的混合液至柱子。**4,000rpm 离心 5 分钟。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 10ml Buffer GW1(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**4,000rpm 离心 5 分钟。
注：Buffer GW1 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 20ml Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**4,000rpm 离心 5 分钟。
注：Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管。4,000rpm 离心 15 分钟以甩干柱子的基质。
12. 将柱子转移至新的 50ml 离心管。**加入 0.6~1ml 预热至 70℃BufferAE 至柱子的膜中央。**室温放置 5 分钟。4,000 rpm 离心 5 分钟。
注：DNA 柱子最小洗脱体积是 600 μ l，小于 600 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 40-60% DNA。若需获得最高产量，建议进行第二次洗脱以获得最高产量两次洗脱可获得 60-80% DNA。。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 转移至 2ml 离心管中，并保存于 2-8℃，长期保存需保存于-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 的技术人员也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
柱子堵塞	
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。
样品用量太多	减少样品用量。富含核酸的样品如肝脏，脾脏，肺脏等样品，组织用量不要超过 10mg。
需要离心去除不消化物质	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。
用移液枪打散沉淀	加入乙醇后，消化液可能会有沉淀析出，用移液枪吸打尽量打散沉淀团。
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。Proteinase K 与 Buffer DL 不能预先混合。
DNA 产量低	
样品 DNA 含量低	组织样品本身含量低，用富含核酸的肝脏，脾脏来提取
柱子堵塞	参照上述情况
洗脱效率不够	增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
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	
延长 RNase 消化时间	动物的内脏如肝脏和肾脏，以及培养细胞富含 RNA，延长 RNase 消化时间至 60 分钟。
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 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，加入正确的乙醇。

Note: