

## 目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	4
准备工作-----	5
方案 1:DNA 小量抽提-----	6
方案 2:DNA 中量抽提-----	7
常见问题回答-----	8

版本: 20401

## 简介

HiPure AS Universal DNA Kits 为血液、牛奶、唾液、培养细胞、组织匀浆液、细菌或其它液体样品的总 DNA 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，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，整个提取过程只需 30 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern blot, 病毒 DNA 检测等实验。

试剂盒	AS Blood Mini Kit	AS Blood Midi Kit
编号	D3010	D3011
样品类型	抗凝血液，凝固血液，血清，血浆，唾液，培养细胞、组织匀浆液，拭子浸泡液、培养细菌等	
样品用量	50~250 $\mu$ l	0.25~1 ml
结合能力	20 $\mu$ g	100 $\mu$ g
柱型	1.5 ml 柱	15 ml 柱

## 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。

试剂盒基于硅胶柱纯化方式。血液或其它液体样品在含高浓度离子化剂的裂解液中裂解，DNA 释放到裂解液中。加入蛋白质沉淀剂沉淀去除蛋白质后，转移上清液至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随滤液流出去除。柱子经 Buffer DW1 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、病毒检测等实验。

## 组 成

## HiPure AS Universal DNA Mini Kit

产品编号	D3010-01	D3010-02	D3010-03	D3010-04
纯化次数	50 次	100 次	250 次	1000 次
HiPure DNA Mini Columns II	50	100	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	50	100	250	10 x 100
Buffer GL1	30 ml	60 ml	150 ml	550 ml
Buffer GL2	10 ml	15 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW1	40 ml	60 ml	150 ml	550 ml
Buffer GW2*	20 ml	50 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer AE	15 ml	30 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

## HiPure AS Universal DNA Midi Kit

产品编号	D3011-01	D3011-02	D3011-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Midi Columns II	10	50	250
1.5 ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer GL1	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer GL2	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GWP	40 ml	200 ml	2 x 400 ml
Buffer GW2*	20 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Buffer AE	15 ml	50 ml	250 ml
说明书	1	1	1

## 保质期

HiPure AS Universal DNA Kits 可在室温下(15~25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2~8°C。低温下, Buffer GL1 和 Buffer GL2 可能会有沉淀形成, 需 55°C 水浴让沉淀完全溶解。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96~100%)
- 灭菌的离心管和移液枪头
- 少量离心机(Mini Kit) 或中量离心机(Midi Kit)
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- (可选) Buffer PBS

## 方案 1. DNA 小量提取方案 (D3010)

该方案适合于从 $\leq 250\mu\text{l}$  人类的抗凝血液、动物血液、凝固血液, 培养细胞、唾液、拭子浸泡液, 组织匀浆液, 或其它体液样品中直接提取总 DNA。

1. **转移 500 $\mu\text{l}$  Buffer GL1 至 1.5ml 离心管中。**
2. **转移 100~250 $\mu\text{l}$  抗凝血液, 匀浆液、细胞悬液、唾液, 或其它体液样品至装有裂解液的离心管中, 高速涡旋 10 秒, 室温放置 5 分钟裂解样品。**
  - 鸟类血液, 因红细胞是带核的, DNA 含量极为丰富, 取 5~10 $\mu\text{l}$  鸡鸭鸭血液, 用 Buffer PBS 或 Elution Buffer 调整总体积至 250 $\mu\text{l}$ 。
  - 鱼类爬行类等非哺乳类, 红细胞带核酸, 取 20~50 $\mu\text{l}$  鱼类或其它动物血液, 用 Buffer PBS 或 Elution Buffer 调整总体积至 200 $\mu\text{l}$ 。
  - 处理凝固的血液时, 用玻璃匀浆器或机械匀浆器将凝血匀浆成液体样品。
  - 处理培养细胞(不超过  $5 \times 10^6$ ): 500  $\times$  g 离心 5 分钟收集细胞, 倒弃培养液, 加入 200 $\mu\text{l}$  PBS 涡旋重悬细胞, 然后按第 2 步进行操作;
  - 组织方案 1: 取 10-50mg 组织, 用 500 $\mu\text{l}$  PBS 或生理盐水, 用玻璃匀浆器或电动匀浆进行

匀浆，取 200 $\mu$ l 匀浆器进行操作。

- 组织方案 2：取 10~30mg 组织，加入 500 $\mu$ l Buffer GL1,用玻璃匀浆器或电动匀浆进行匀浆，然后补加入 200 $\mu$ l 灭菌水，颠倒混匀。
  - 处理拭子：取 200-250 $\mu$ l 拭子浸泡液进行操作。
  - 细菌：取 0.5-1.5ml 细菌培养液，10,000  $\times$  g 离心 1 分钟收集细胞，倒弃培养液。加入 200 $\mu$ l Buffer TE/lysozyme (3mg/ml)，涡旋重悬细菌，室温放置 5-15 分钟消化细胞壁。
3. **加入 100 $\mu$ l Buffer GL2，立即最高速度涡旋 10~15 秒或直至形成均一的混合液。**  
加入 GL2 会产生大量的蛋白质沉淀，这一步需要剧烈涡旋打散沉淀，以防止沉淀粘附基因组 DNA 一起沉淀造成损失。
  4. **室温下，13,000  $\times$  g 离心 10 分钟。**
  5. **把 DNA 柱装在 2ml 收集管中。转移全部上清液至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。**  
若需要提取病毒 DNA/RNA：转移 500 $\mu$ l 上清液至新的离心管中，加入 250 $\mu$ l 异丙醇，涡旋混匀后再过柱。
  6. **倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer DW1 至柱子上。静置 1 分钟。**  
13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  7. **倒弃流出液，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，**  
13,000  $\times$  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。
  8. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 $\mu$ l Buffer GW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。**  
12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。  
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
  9. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 50-100 $\mu$ 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。**
  10. **转移洗脱液或 50-100 $\mu$ 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。

## 方案 2. DNA 中量提取方案(D3011)

该方案适合于从 0.5-1ml 抗凝血液或其它体液样品中直接提取总 DNA。

1. **转移 2.5 ml Buffer GL1 至 15ml 离心管（自备）中。**
2. **转移 0.5~1ml 抗凝血液、组织匀浆液、细胞悬液、唾液，或其它体液样品至装有裂解液的离心管中，高速涡旋 10 秒，室温放置 10 分钟裂解样品，期间颠倒混匀数次。**
  - 鸟类血液，因红细胞是带核的，DNA 含量极为丰富，取 25~100 $\mu$ l 鸡鸭血液，用 Buffer PBS 或 Elution Buffer 调整总体积至 1000 $\mu$ l。
  - 鱼类爬行类等非哺乳类，红细胞带核酸，取 100~250 $\mu$ l 鱼类或其它动物血液，用 Buffer PBS 或 Elution Buffer 调整总体积至 1000 $\mu$ l。
  - 处理凝固的血液时，用玻璃匀浆器或机械匀浆器将凝血匀浆成液体样品。
  - 处理培养细胞(不超过  $2 \times 10^7$ ): 500  $\times$  g 离心 5 分钟收集细胞，倒弃培养液，加入 1000 $\mu$ l PBS 涡旋重悬细胞，然后按第 2 步进行操作；
  - 组织方案 1: 取 50-150mg 组织，用 1000 $\mu$ l PBS 或生理盐水，用玻璃匀浆器或电动匀浆进行匀浆，取 200 $\mu$ l 匀浆器进行操作。
  - 组织方案 2: 取 50~150mg 组织，加入 2.5ml Buffer GL1,用玻璃匀浆器或电动匀浆进行匀浆，然后补加入 1000 $\mu$ l 灭菌水，颠倒混匀。
  - 处理拭子: 取 1000 $\mu$ l 拭子浸泡液进行操作。
  - 细菌: 取 2~5ml 细菌培养液( $1 \times 10^9$ )，5,000  $\times$  g 离心 10 分钟收集细胞，倒弃培养液。加入 1000 $\mu$ l Buffer TE/Lysozyme (3mg/ml)，涡旋重悬细菌，室温放置 5-15 分钟消化细胞壁。
3. **加入 0.5ml Buffer GL2，立即最高速度涡旋混匀 30~60 秒或直至形成均一的混合液。**

加入 GL2 会产生大量的蛋白质沉淀，这一步需要剧烈涡旋打散沉淀，以防止沉淀粘附基因组 DNA 一起沉淀造成损失。
4. **室温下，4,000~5,000rpm 离心 20 分钟。**

5. 将 HiPure DNA Midi Column II 套在 15ml 收集管中，转移全部上清液至柱子中。  
4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 3ml Buffer GWP 至柱子，静置 1 分钟。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 3ml Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。  
4,000~5,000rpm 离心 3 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。
8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 3ml Buffer GW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。  
4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。
9. 取出柱子，室温放置 10 分钟进一步干燥柱子。倒弃收集管的废液，用灭菌水或超纯水清洗一次，晾干备用。
10. 把柱子装回 15ml 离心管中，加入 500 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，室温放置 5 分钟。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
11. 再加入 300~500 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，室温放置 5 分钟。  
4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中，保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题解答

现象	原因及解决方法
<b>DNA 溶液带颜色</b>	
样品裂解不充分	重新提取，加入 Buffer GL1 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer GL1 充分混匀。若裂解液非常粘稠，用移液枪或注射器吸打几次降低溶液的粘稠度。
蛋白质去除不干净	重新提取，加入 Buffer GL2 后要充分混匀。
<b>柱子堵塞</b>	
样品裂解不充分	重新提取，加入 Buffer GL1 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer GL1 充分混匀。若裂解液非常粘稠，用移液枪或注射器吸打几次降低溶液的粘稠度。
样品用量太多	减少样品用量。
蛋白质去除不干净	重新提取，加入 Buffer GL2 后要充分混匀。
<b>DNA 产量低</b>	
样品 DNA 含量低	样品本身含量低，血浆，血清以及分泌液核酸很低
柱子堵塞	参照上述情况
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。
样品裂解不充分	重新提取，加入 Buffer GL1 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer GL1 充分混匀。若裂解液非常粘稠，用移液枪或注射器吸打几次降低溶液的粘稠度。
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
加入 Buffer GL1 和 Buffer GL2 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer GL1 和 Buffer GL2 后必须充分混匀
A260/230 太高	Buffer GL1 溶液中的异硫氰酸胍在 A230 中有较高的吸收峰。使用该产品，A260/230 小于 1.0。实验表明，该产品得到的 DNA 不会影响下游的运用，包括测序，连接，定量 PCR，PCR，酶切等。