

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:血液 DNA 小量抽提	6
方案 2:血液 DNA 中量抽提	7
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

HiPure AS Blood DNA Kits 为血液、血清、血浆、牛奶、唾液、或其它液体样品以及培养细胞的总 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, 培养细胞等	
样品用量	50~250 μ l	0.25~1 ml
结合能力	20 μ g	100 μ 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 Blood DNA Mini Kit

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

HiPure AS Blood 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	100 ml	2 x 350 ml
Buffer GL2	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer DW1	40 ml	200 ml	2 x 400 ml
Buffer DW2*	20 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Buffer AE	15 ml	30 ml	120 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure AS Blood DNA Kits 可在室温下(15~25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2~8℃。低温下，Buffer GL1 和 Buffer GL2 可能会有沉淀形成，需 55℃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. 血液 DNA 小量提取方案(D3010)

该方案适合于从 $\leq 250\mu\text{l}$ 人类的抗凝血液或其它体液样品中直接提取总 DNA。

1. **转移 500 μl Buffer GL1 至 1.5ml 离心管中。**
2. **转移 100~250 μl 抗凝血液，唾液，或其它液体样品至装有裂解液的离心管中。**
高速涡旋 15~20 秒。
鸟类，鱼类等非哺乳类动物的血液红细胞是带核的，DNA 含量极为丰富。一次只能处理 5-10 μl 血液，用 Buffer PBS 或 Elution Buffer 调整总体积至 200 μl 。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 5×10^6): 400xg 离心 5 分钟收集细胞。倒弃培养液，加入 200 μl PBS 涡旋重悬细胞，然后按第二步进行操作；
3. **加入 100 μl Buffer GL2 至样品中，** 高速涡旋 15~20 秒。
4. 室温下，13,000 \times g 离心 10 分钟。
5. 把 DNA 柱装在 2ml 收集管中。转移上清液或混和液至柱子中。13,000 \times g 离心 1 分钟。
若需要提取病毒 DNA: 转移 500 μl 上清液至新的离心管中，加入 250 μl 异丙醇，涡旋混匀，室温放置 5 分钟，再按第 5 步进行操作。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μl 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 600 μl 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. (可选)倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 600 μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 13,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 50-200 μl Buffer AE 至柱子的膜中央。** 放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

方案 2. 血液 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 0.5-1ml 抗凝血液，唾液，或其它液体样品至 15ml 离心管中。

若样品体积不够 1ml，用灭菌水调整至 1ml。由于鸟类，鱼类等非哺乳类动物的血液红细胞是带核的，DNA 含量极为丰富。一次只能处理 20-100 μ l 血液，用灭菌水调整总体积至 750 μ l。处理凝血时，用匀浆器进凝血匀浆成液体样品。处理培养细胞(不超过 2×10^7): 离心收集细胞。倒弃培养液，并加入 750 μ l 灭菌水涡旋重悬细胞，然后按第二步进行操作。

2. 加入 2.5ml Buffer GL1 至样品中。高速涡旋混匀 60 秒，室温静置 10 分钟。

若裂解液比较粘稠，用 1ml 移液枪吸打 10 次打散样品并延长室温静置至 30 分钟。

3. 加入 0.5ml Buffer GL2 到样品中。高速涡旋混匀 60 秒或直至样品充分混匀。

4. 室温下，5,000rpm 离心 15 分钟。

5. 把上清液(第四步获得的)倒入至 HiPure DNA Midi Column II 中，并把柱子装回带沉淀的 15ml 离心管中。5,000rpm 离心 5 分钟。

6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 3ml Buffer DW1 至柱子上。静置 2 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。

7. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 3ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中，5,000 rpm 离心 3 分钟。

Buffer DW2 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. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 3ml Buffer DW2(已用乙醇稀释)至柱子中，5,000 rpm 离心 3 分钟。

9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。5,000rpm 离心空柱 10 分钟。

10. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 300 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。5,000 rpm 离心 3 分钟。

(可选) 若需获得最高产量，再加入 300 μ l Buffer AE 进行第二步洗脱。

11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

现象	原因及解决方法
DNA 溶液带颜色	
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。
柱子堵塞	
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。
DNA 产量低	
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。
OD260/OD280 比值不正常	
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。