目 录

简 介---------- 2

原 理---------- 2

试剂盒组成---------- 3

保质期---------- 3

准备工作---------- 4

方案 1:昆虫组织 DNA 微量抽提方案---------- 5

方案 2:昆虫组织 DNA 高通量抽提方案---------- 7

常见问题回答---------- 8

版本: 2013-01

简 介

HiPure Insect DNA Kits 为昆虫组织样品的总 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。HiPure Insect DNA Kit 一次可处理小于 10mg 组织样品。HiPure Insect DNA 96 Kits 一次可高通量处理 96 个昆虫组织样品。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

试剂盒	Insect DNA Kit	Insect DNA 96 Kit
编号	D3129	D3139
柱型	1.5 ml 柱	96 孔板

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，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，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 Insect DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液(Buffer ITL)和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入 Buffer IL 和乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随溶液滤出去除。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、病毒检测等实验。

组 成

HiPure Insect DNA Kit

产品编号	D3129-01	D3129-02	D3129-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ITL	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer IL*	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	22 ml	88 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure Insect DNA 96 Kit

产品编号	D3139-01	D3139-02	D3139-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure DNA Plate	1	4	20
1.6ml Collection Tubes	1	4	20
Buffer ITL	30 ml	120 ml	120 ml
Buffer IL*	15 ml	50 ml	120 ml
Buffer GW1*	44 ml	2 x 110 ml	3 x 220 ml
Buffer GW2*	50 ml	4 x 50 ml	5 x 100 ml
Proteinase K	50 mg	170 mg	860 mg
Protease Dissolve Buffer	5 ml	15 ml	50 ml
Buffer AE	15 ml	60 ml	200 ml
说明书	1	1	1

注：Buffer IL、Buffer GW1 和 Buffer GW2 使用前须加入无水乙醇进行稀释。

保 质 期

本产品室温***(15~25***℃***)***可保存 ***18*** 个月。***Proteinase K*** 干粉室温运输和保存，长期保存***(>6*** 个月）建议放置于***-20~8***℃。溶解后的 ***Proteinase K*** 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。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 小型离心管(12,000 x g)
- 55℃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，保存于-20℃。
- Buffer IL 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 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。

方案 1. 昆虫动物组织 DNA 提取

该方案适合于从小于 10mg 昆虫组织中提取 DNA，以下离心操作都在室温进行。

1. 把小于 10mg 昆虫样品剪切成尽量小的碎片，并转移至 1.5ml 离心管中。**加入 250μl Buffer ITL 和 20μl Proteinase K 至样品中，振荡或颠倒混匀。**55℃水浴 6 小时或过夜消化样品，水浴期间需偶尔颠倒混匀，或放置于振荡水浴涡中。

   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。处理难裂解的昆虫样品，蛋白酶 K 分两次加入可提取消化效果，消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。

2. (可选)13,000 x g 离心 3 分钟，转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。

   若消化液比较浑浊或存在明显未消化的颗粒，不要省略此步。

3. **加入 500μl Buffer IL(已用乙醇稀释)至消化液中，**涡旋混匀 30 秒。

   Buffer IL 使用前须加入 1 倍体积的无水乙醇进行稀释，按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

4. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液(包括沉淀)至柱子中。**10,000 x g 离心 30~60 秒。

5. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600μl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 x g 离心 30~60 秒。

   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。

6. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 x g 离心 30~60 秒。

   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。

7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。13,000 × g 离心 3 分钟。

8. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~30μl 预热至 55℃ Buffer AE 或 Buffer TE 至柱子的膜中央。**放置 2 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。

9. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需保存于-20℃。

方案 2. 昆虫动物组织 DNA 高通量提取

该方案可高通量从 96 个昆虫组织中提取 DNA，以下离心操作都在室温进行。

1. 把小于 10mg 昆虫样品剪切成尽量小的碎片，并转移至 96 孔板(自备)中。**加入 250μl Buffer ITL 和 20μl Proteinase K 至样品中，涡旋混匀。**55℃水浴 6 小时或过夜消化样品，水浴期间需偶尔颠倒混匀或放置于振荡水浴涡中。

   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。处理难裂解的昆虫样品，蛋白酶 K 可两次加入可提取消化效果，消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。

2. **加入 500μl Buffer IL(已用乙醇稀释)至消化液中，**振荡混匀 30 秒。

   Buffer ITL 使用前须加入 1 倍的无水乙醇进行稀释，按瓶子标签或说明书指示进行稀释。

3. 把 HiPure DNA Plate 装在收集板中。**转移混合液(包括沉淀)至结合板中。**3,000 x g 离心 3~5 分钟。

4. 倒弃滤液，把结合板装回收集板中。**每孔加入 700μl Buffer GW1(已用乙醇稀释)至结合板中。**3,000 x g 离心 3~5 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。

5. 倒弃滤液，把结合板装回收集板中。**每孔加入 700μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至结合板中。**3,000 x g 离心 3~5 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。

6. 倒弃滤液，把结合板装回收集板中。**每孔加入 700μl Buffer GW2(已用乙醇稀释)至结合板中。**3,000 x g 离心 5 分钟。

7. 倒弃流出液，把结合板重新装回收集板中，3,000 × g 离心 15 分钟。

8. 将结合板装在新的收集板(另配)中。**每孔加入 50μl 预热至 55℃ Buffer AE 或 Buffer TE 至结合板的膜中央。**放置 3 分钟，3,000 × g 离心 5 分钟。

9. **再加入 50μl 预热至 55℃ Buffer AE 或 Buffer TE 至结合板的膜中央。**放置 3 分钟，3,000 × g 离心 5 分钟。

10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8℃，长期保存需保存于-20℃。

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 技术人员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	用液氮或其它匀浆工具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。
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 13,000 x g 离心 3 分钟去除末消化的物质。
用移液枪打散沉淀	若加入乙醇后有沉淀析出，用移液枪吸打打散沉淀团。
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。分装保存 Proteinase K 避免反复冻融。
DNA 产量低	
样品 DNA 含量低	组织样品本身含量低，用富含核酸的组织样品来提取
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	
加入 RNase 进行消化	在消化液中加入 5ul RNase A 进行消化
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。Proteinase K 须保存于-20℃。
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，加入正确的乙醇。