

## HiPure Mollusc DNA Kit

### 软体动物组织 DNA 抽提试剂盒

本产品适合于从 1~50mg 水生生物、软体动物、低等生物的组织样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，整个提取过程只需 30~60 分钟。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	D3128-01	D3128-02	D3128-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer MTL	7 ml	40 ml	180 ml
Buffer DL	7 ml	40 ml	180 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2 *	6 ml	20 ml	2 × 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	60 ml

### 保存条件

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 MTL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 55°C 和 70°C 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。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。
- 溶解 RNase A (15mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 RNase A 至终浓度为 15mg/ml, 颠倒混匀让 RNase A 充分溶解。RNase A 干粉可在室温下, 但溶解的 RNase A 须保存于-20~8°C。
- (可选, 复杂组织样品)酚氯仿异戊醇(25:24:1)
- 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。

## 实验步骤

### A. 处理 1~20mg 软体动物样品:

1. 将 1~20mg 组织处理成尽量小的碎片, 转移至 1.5ml 离心管。**加入 220 $\mu$ l Buffer MTL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 混匀。**55°C 振荡温浴 1~3 小时或过夜。  
把组织块剪切成尽量小碎片可缩短消化时间。液氮研磨和玻璃匀浆器可达到缩短消化时间的目的。消化时间取决于样品的类型和匀浆效果。一般组织需 1~3 小时。若需处理 20~50mg 组织时, 只需将 Buffer MTL, Buffer DL 和无水乙醇提升一倍即可。
2. **加入 10 $\mu$ l RNase A 至消化液中混匀, 室温静置 10 分钟。**
3. (可选: 消化液浑浊或存在明显颗粒)10,000  $\times$  g 离心 5 分钟, 转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
4. **加入 220 $\mu$ l Buffer DL 至消化液中, 涡旋混匀 15 秒, 70°C 水浴 10 分钟。**
5. **加入 220 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中, 涡旋混匀 15 秒。**  
处理富含 DNA 的组织时, 加入乙醇会有沉淀形成, 用移液枪吸打 5~10 次打散沉淀。
6. 把 HiPure gDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液(包括沉淀)至柱子中。**

10,000 × g 离心 1 分钟。

若柱子出现堵塞，13,000 × g 离心 3 分钟。若混合液体积超过 750µl 时，分次上柱。

7. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer GW1 至柱子中。** 10,000 × g 离心 1 分钟。
8. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2 至柱子中。** 10,000 × g 离心 1 分钟。
9. **(可选) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650µl Buffer GW2 至柱子中。** 10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心 2 分钟。
11. **将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100µl 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央。** 放置 3 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。  
若需获得最高产量，再加入 30~100µl Buffer AE 至柱子进行第二次洗脱。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需放置于 -20°C。

## **B. 复杂组织样品(富含脂类、多糖类、色素类组织样品):**

该方案适合处理复杂的组织样品(富含脂类、色素和多糖类样品)，如肠道内容物、脂肪类组织、含多糖的内脏团，富含色素的组织样品等。

1. 把 20~50mg 组织处理成尽量小的碎片，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 600µl Buffer MTL 和 20µl Proteinase K，混匀。** 55°C 温浴 1~3 小时或过夜，其间颠倒混匀数次。若需提取组织中寄生微生物 DNA，90°C 再水浴 20 分钟进一步裂解微生物细胞。
3. **加入 600µl 酚氯仿异戊醇(25:24:1)至裂解液中，颠倒混匀 30~50 次。**
4. 10,000 × g 离心 5 分钟。转移 500µl 上清液至新的 2.0ml 离心管中。
5. **加入 10µl RNase A 至消化液中，颠倒混匀。** 室温静置 15~30 分钟。
6. **加入 500µl Buffer DL 和 500µl 无水乙醇至上清液中，涡旋混匀 15 秒。** 按 A 方案的第 6~12 步进行操作。

加入乙醇时会有沉淀形成，属正常现象。用移液枪吸打 5-10 次打散沉淀团。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **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。
- **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。
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer DL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer DL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质:** 若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 x g 离心 5 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分:** 延长消化时间让样品充分消化
- 样品中 DNA 含量低，用富含核酸的肝脏/脾脏来提取
- Buffer GW1/GW2 没有加入乙醇稀释
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量
- **洗脱不充分:** 洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。

### 3. DNA 纯度不达标

- **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
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer DL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer DL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer DL 充分混匀
- **样品用量太多:** 减少样品用量
- **复杂样品:** 富含代谢物质的组织样品，按 B 方案进行操作

### 4. RNA 污染

- **样品富含 RNA:** 样品富含 RNA，延长 RNase 消化时间至 30~60 分钟