

# M5 HiPer Universal DNA Mini Kit

## 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Universal DNA Mini Kit	50T	MF033-plus-01
M5 HiPer Universal DNA Mini Kit	200T	MF033-plus-04

**【储存条件】** 室温储存 12 个月。

### 【产品简介】

本试剂盒适合于从新鲜或冷冻的动物组织（比如鼠尾、肝脏等），细胞，血液，细菌等多种样品中提取高纯度总 DNA。本品可纯化获得分子量最大为 50kb 的 DNA 片段，纯化过程不需要使用苯酚或氯仿等有毒溶剂，无需乙醇沉淀。本试剂盒采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤步骤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可得到高纯度 DNA。纯化得到的 DNA 可以直接用于酶切，PCR，Real-Time PCR，文库构建，Southern Blot，分子标记等下游实验。

**【自备试剂】** 无水乙醇

Enzymatic Lysis Buffer（提取革兰氏阳性菌基因组 DNA 时须准备）。Enzymatic Lysis Buffer 配方：20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 1.2% Triton X-100; 终浓度为 20mg/ml 的 Lysozyme（溶菌酶）。

### 【产品组份】

	50T
Buffer GTL	15 ml
Buffer GL	15 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer GE	15 ml
Proteinase K**	1 ml
Spin Columns DM with Collection Tubes	50 个

**\*\* Proteinase K (蛋白酶 K):** 可常温保存，开盖后防止空气及枪头污染，放入 4 度可以保存更长时间。如果出现絮状物，是因为溶解缓冲液中的钙离子在磷酸盐中可能会产生不溶解性沉淀，离心取上清，不影响使用效果。

### 【实验前准备及重要注意事项】

1. 样品应避免反复冻融，否则会导致提取 DNA 片段较小且提取量下降。
2. 如果提取次生代谢产物大量积累或细胞壁厚的细菌培养物的基因组，建议在对数生长期早期收集样品。
3. 第一次使用前应按试剂瓶标签的说明在 **Buffer GW1 和 Buffer GW2 中加入无水乙醇**。
4. 使用前请检查 Buffer GTL 和 Buffer GL 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将 Buffer GL 和 Buffer GTL 于 56°C 水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对 RNA 污染比较敏感，可以在加入 Buffer GL 前加入 4μl DNase-Free 的 RNase A (100mg/ml)，RNase A 本试剂盒并未提供，可单独订购。

## 【操作步骤】

### 血液及细胞样本基因组提取

1. 材料处理
  - a) 如果提取材料为哺乳动物抗凝血液（无核红细胞），可直接向 50–200 $\mu$ l 新鲜或冷冻的抗凝血液样品中加入 **Buffer GTL** 补足至 200 $\mu$ l。
  - b) 如果提取材料为禽类，鸟类，两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，取 5–10 $\mu$ l 新鲜或冷冻的抗凝血液样品，加入 **Buffer GTL** 补足至 200 $\mu$ l。
  - c) 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为 5x10<sup>6</sup>个细胞），2000 rpm (400xg) 离心 5 分钟，弃尽上清，加 200 $\mu$ l **GTL**，振荡至样品彻底悬浮。  
**注意：如需去除 RNA，可在上述步骤完成后，加入 4 $\mu$ l 浓度为 100mg/ml 的 RNase A 溶液，涡旋 15 秒，室温放置 2 分钟。**
2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 溶液,混匀。
3. 加入 200 $\mu$ l **Buffer GL**，涡旋振荡充分混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入 200 $\mu$ l 无水乙醇，涡旋振荡充分混匀，短暂离心。  
**注意：1) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。**  
**2) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。一些组织在加入 BufferGL 和无水乙醇后可能形成溶胶状产物，此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。**
5. 上一个步骤中所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm（约 13,400 xg）离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l **Buffer GW1**（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l **Buffer GW2**（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。  
**注意：如需进一步提高 DNA 纯度，可重复步骤 7。**
8. 12,000 rpm 离心 2 分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。  
**注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。**
9. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 50–200 $\mu$ l **Buffer GE** 或灭菌水，室温放置 2–5 分钟，12000rpm 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，–20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。  
**注意：1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0–8.5（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。**  
**2) Buffer GE 在 65–70 $^{\circ}$ C 水浴预热，离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量；用另外的 50–200  $\mu$ l BufferGE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。**  
**3) 如果要提高 DNA 的终浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置 2–5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟；若洗脱体积小于 200  $\mu$ l，可以增加 DNA 的终浓度，但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1  $\mu$ g，推荐用 50  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。**  
**4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用 Buffer GE 洗脱并于–20 $^{\circ}$ C 保存。**

### 动物组织基因组提取

1. 材料处理  
如果提取材料为动物组织，取 25 mg（脾组织用量应少于 10 mg）；如果材料为鼠尾，取一段长度为 0.4–0.6 cm 的大鼠鼠尾或两段长度为 0.4–0.6 cm 的小鼠鼠尾。
  - a. 样本进行液氮研磨或切成小块后置于 1.5 ml 离心管中，加入 180  $\mu$ l **Buffer GTL**，将不同样品做好标记。
  - b. 若使用匀浆器处理样本，匀浆前向样本中加入不超过 80  $\mu$ l **Buffer GTL**，匀浆后加入 100  $\mu$ l **Buffer GTL**。  
**注意：1) 确保各组织的量不要超出推荐范围。**

**2) 组织样本在加入 Buffer GTL 之前用液氮研磨或加入 Buffer GTL 用匀浆器匀浆处理, 可以增加裂解效率。**

2. 加入 **20  $\mu$ l Proteinase K**, 涡旋震荡使样品彻底混匀。56°C 水浴, 直至组织完全裂解, 孵育过程中可每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样品分散。  
注意: 1) 不同组织消化时间不同, 通常 1-3 小时即可完成, 鼠尾需要消化 6-8 小时, 必要时过夜消化, 不会影响后续操作。  
2) 如果孵育和涡旋震荡后仍然有胶状物质, 延长 56°C 孵育时间或再加入 20  $\mu$ l Proteinase K 消化。  
3) 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4 $\mu$ l 的浓度为 100mg/ml 的 RNase A 溶液, 涡旋 15 秒, 室温放置 5-10 分钟。
3. 加入 **200  $\mu$ l Buffer GL**, 涡旋震荡充分混匀, 70°C 水浴 10 分钟。短暂离心后加入 **200  $\mu$ l 无水乙醇**, 涡旋震荡充分混匀。  
注意: 1) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。  
2) 加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。一些组织 (如脾, 肺) 在加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能形成溶胶状产物, 此时推荐进行剧烈震荡或涡旋处理。
4. 短暂离心, 将步骤 3 所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm (约 13,400xg) 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 **500  $\mu$ l Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇)**, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 **500  $\mu$ l Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇)**, 12,000 rpm。离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。  
**注意: 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复步骤 6。**
7. 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。  
**注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切, PCR 等)。**
8. 将吸附柱置于一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 **50-200  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水**, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20°C 保存 DNA。  
**注意:** 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。  
2) Buffer GE 在 65-70°C 水浴预热, 离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量; 用另外的 50-200  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。  
3) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟; 若洗脱体积小于 200  $\mu$ l, 可以增加 DNA 的终浓度, 但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1  $\mu$ g, 推荐用 50  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。  
4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响, 如需长期保存, 推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20°C 保存。

**细菌基因组提取**

1. 细菌样本预处理
  - 1a. 革兰氏阴性菌
    - (1) 取**细菌培养物 1-5 ml** ( $10^6$ - $10^8$  个细胞, 最多不超过  $2 \times 10^9$  个细胞) 置于离心管 (自备) 中, 12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。
    - (2) 向沉淀中加入 **180  $\mu$ l Buffer GTL**, 振荡使菌体重悬。
    - (3) 加入 **20  $\mu$ l Proteinase K**, 涡旋混匀, 56°C 孵育, 直至菌体完全裂解, 孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。  
**注意: 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4  $\mu$ l 浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。**
    - (4) 加入 200  $\mu$ l Buffer GL, 涡旋震荡混匀。

## 1b. 革兰氏阳性菌

- (1) 取**细菌培养物** 1-5 ml ( $10^6$ - $10^8$ 个细胞, 最多不超过  $2 \times 10^9$ 个细胞) 置于离心管(自备)中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 尽量吸净上清。
- (2) 加入 **180  $\mu$ l Enzymatic Lysis Buffer** (自备) 使菌体重悬。
- (3) 37°C 孵育 30 分钟。
- (4) 加入 **20  $\mu$ l Proteinase K** 涡旋震荡, 充分混匀。加入 **200  $\mu$ l Buffer GL**, 涡旋震荡混匀。56°C 孵育 30 分钟。  
**注意:** 1) 如果需要, 95°C 孵育 15 分钟可以使病原体失活, 但是 95°C 孵育会造成一些 DNA 的降解。  
2) 如需去除 RNA, 可在上述步骤完成后, 加入 4  $\mu$ l 浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 5-10 分钟。

2. 加入 **200  $\mu$ l 无水乙醇**, 涡旋震荡充分混匀。

**注意:** 加入无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

## 3. 将步骤 2 所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入到已装入收集管的吸附柱(SpinColumns DM)中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

4. 向吸附柱中加入 **500  $\mu$ l Buffer GW1** (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。5. 向吸附柱中加入 **500  $\mu$ l Buffer GW2** (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

**注意:** 如需进一步提高 DNA 纯度, 可重复步骤 5。

## 6. 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

**注意:** 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR 等)。

7. 将吸附柱置于一个新的离心管(自备)中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 **50-200  $\mu$ l Buffer GE** 或灭菌水, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20°C 保存 DNA。

**注意:** 1) 如果下游实验对 pH 值或 EDTA 敏感, 可以用灭菌水洗脱。洗脱液的 pH 值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 时洗脱效率不高。

2) Buffer GE 在 65-70°C 水浴预热, 离心之前室温孵育 5 分钟可以增加产量; 用另外的 50-200  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

3) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟; 若洗脱体积小于 200  $\mu$ l, 可以增加 DNA 的终浓度, 但可能会减少总产量。如果 DNA 的量小于 1  $\mu$ g, 推荐用 50  $\mu$ l Buffer GE 或灭菌水洗脱。

4) 因为保存在水中的 DNA 会受到酸性水解作用的影响, 如需长期保存, 推荐用 Buffer GE 洗脱并于 -20°C 保存。

## 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。