

HiPure Gel Pure DNA Mini Kit

凝胶 DNA 回收试剂盒

产品简介

本产品适合于从各种浓度的琼脂糖凝胶中回收 60bp-20Kbp DNA 片段。本产品也适合于从 PCR 产物中，酶促反应液中，或由各种方法获得的粗制的 DNA(包括基因组 DNA) 中回收纯化 DNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可以在 10~15 分钟完成纯化工作。DNA 回收效率高达 80%，纯化的 DNA 可直接用于自动测序，连接，酶切，PCR，标记等。HiPure Gel Pure DNA Micro Kit 采用微量柱，适合于从 100~300mg 的凝胶块中回收 DNA，柱子的最少洗脱体积低至 7 μ l，可最大程度提高产物的浓度。HiPure Gel Pure DNA Mini Kit 采用常规小量柱，适合于各种情况的 DNA 回收。

产品组份

产品编号	D2111-01	D2111-02	D2111-03
次数	50 Preps	100 Preps	250 Preps
Buffer GDP	50 ml	80 ml	200 ml
Buffer DW2*	10 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	6 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Columns	50	100	250
2 ml Collection Tubes	50	100	250

版本号：202401

保存条件

本产品可以室温保存 18 个月。低温下，Buffer GDP 可能有沉淀出来，使用时须加热至 55 $^{\circ}$ C 使沉淀溶解。HiPure DNA Mini Column(D2111)可结合 15 μ g 的 DNA。

纯化原理

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因素吸附核酸, 而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。含 DNA 的琼脂糖凝胶和高浓度异硫氰酸胍溶液 Buffer GDP 混和, 升温让凝胶充分溶化, DNA 释放至溶液中, 转移至硅胶柱中吸附 DNA, 而凝胶或其它杂质则从柱子流出。柱子再经 Buffer GDP 清洗去除残留的凝胶和杂质, 然后经含乙醇的洗涤液 Buffer DW2 脱盐, 最后用 Elution Buffer 或灭菌水洗脱出 DNA。

准备事项

- 在 Buffer DW2 中, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 并于室温保存。
- 小型高速离心机 (~12,000 x g)
- 水浴锅温度设至 50~55°C

实验步骤 1: 琼脂糖凝胶 DNA 回收

1. 配制合适浓度的琼脂糖凝胶, 电泳分离 DNA 片段。当 DNA 片段分离后, 把凝胶放置于紫外灯下, 快速切下含目的 DNA 片段的凝胶, 并尽量去除多余的凝胶。
2. 称取凝胶块的重量, 并转移至 1.5 或 2.0ml 离心管中。按 100mg 凝胶块相当 100 μ l 体积计算, 加入 1~1.5 倍体积 Buffer GDP, 50~55°C 水浴 10~15 分钟, 让凝胶块完全溶解。水浴期间, 颠倒混匀 3 次加速溶胶。

若凝胶块重量为 200mg, 则需加入 200~300 μ l Buffer GDP。凝胶浓度超过 2.0% 时, 加入 1.5 倍体积的 Buffer GDP。处理超过 5KB 的片段, 加 3 倍体积(凝胶体积)溶胶后, 再加入 1 倍体积(凝胶体积)异丙醇混匀后再按第三步进行操作。本产品提供的 Buffer GDP, 只足够处理 500mg 凝胶, 处理更大量的凝胶时, GDP 可以另外订购。处理对温度敏感的 DNA 片段(复杂回文结构或易解链), 把凝胶处理成尽量小的碎片后, 常温振荡 10-15 分钟溶解凝胶, 减少高温对 DNA 的解链和损伤。

3. 短暂离心收集管壁上的液滴。将 HiPure DNA Mini Column 套在收集管中。把

≤700µl 溶胶液转移至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。

- 4 (可选: 溶胶液超过 700µl) 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 5 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 150µl Buffer GDP 至柱子中。静置 1 分钟。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 6 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 600µl Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
Buffer DW2使用前, 按瓶子上的标签指示, 用无水乙醇进行稀释。
- 7 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 300µl Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。12,000 × g 离心 2 分钟。

取出柱子时, 不要让柱子底部接触到液体, 若碰到了液体, 倒弃液体后再离心 1 分钟。对某些敏感应用(需将大部分洗脱液加入连接反应液时): 打开柱子的盖子, 空气干燥 5~10 分钟以彻底去除乙醇。

- 8 把柱子套在 1.5ml 离心管中, 加入 15~30µl Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。丢去柱子, 把 DNA 保存于-20℃。

若需要获得最高产量, 建议重复第8步进行第二步洗脱。若回收大于5KB以上的片段时, 最好把Elution Buffer预热至55℃, 并重复2-3次洗脱。重复洗脱时, 可以把得到洗脱液再转移至柱子进行第二次或第三次洗脱, 提高回收率的同时又可获得更高浓度的DNA。

Elution Buffer成分为10mM Tris,pH8.5可以用Buffer TE或灭菌水(pH>6.5)代替。

实验步骤 2: 从反应液中纯化 DNA

1. 短暂离心 PCR 产物, 酶促反应液, 或粗制 DNA 产物(包括基因组 DNA)。用移液枪测量其体积, 并转移至灭菌的 1.5 或收集管中。

若样品体积小于 100µl, 用灭菌水调整至 100µl。高浓度的基因组 DNA 最好用灭菌水稀释至 300µl, 以提高回收效率。

- 2 加入等倍体积的 Buffer GDP, 颠倒或涡旋混匀。

若需回收小于 100bp DNA 片段，再加入 1.5 倍体积无水乙醇(样品+Buffer GDP 的体积)

- 3 将 HiPure DNA 柱子套在收集管中。把混合液转移至 DNA 柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。按实验步骤 1 的第 6~8 步进行操作。

常见问题

1. 回收效率低

- **凝胶未充分溶解:** 溶胶时，50~55°C 水浴 7~12 分钟，其间颠倒混匀数次，让凝胶充分溶解。
- **凝胶用量过多:** 过量的凝胶会降低回收率，切胶时尽量去除多余的凝胶。
- **溶胶液不足:** Buffer GDP 加入量不能低于凝胶重量的 1 倍。处理 >2% 凝胶时，Buffer GDP 加入量最好控制在 2~3 倍。
- **洗脱不充分:** 建议用洗脱液洗脱两次，以获得最高的回收率。洗脱液必须加入柱子的膜中央。洗脱效率取决于洗脱体积和次数。
- **试剂准备有误:** Buffer DW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。

2. 回收后出现杂带

- **DNA 变性:** 有些 DNA 片段对温度比较敏感，杂带有可能是单链的 DNA。降低溶胶温度至 37~50°C。降低温度，可延长溶胶时间至 20~40 分钟让凝胶充分溶解。

3. 盐污染

- **A260/230 太低:** Buffer GDP 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 通常小于 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。

4. 连接不理想

- **乙醇污染:** 洗脱 DNA 前，打开柱子的盖子，空气干燥 10~15 分钟以彻底去除乙醇。
- **核酸变性:** 降低溶胶温度至 37~50°C。降低温度，可延长溶胶时间至 20~40 分钟让凝胶充分溶解。降低温度能有效减少核酸的脱嘌呤和变性的影响。