

目 录

简 介	2
原 理.....	2
保质期.....	2
试剂盒组成.....	3
准备工作.....	3
方案 1: HiPure Poly Gel DNA Kit 离心方案.....	4
方案 2: HiPure Poly Gel RNA Kit 离心方案.....	6
常见问题回答.....	8

版本: 2010-10

简介

聚丙烯酰胺凝胶电泳常常用于核酸的高分辨率的电泳分析。DNA 或 RNA 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，常常需要从凝胶中切出所需要 DNA 或 RNA 片段，然后再进行回收。

- HiPure Poly Gel DNA Kit 适合于从各种浓度的变性或非变性的聚丙烯酰胺凝胶中回收 50-4000bp 的 DNA 片段。DNA 回收效率可高达 60-80%，纯化的 DNA 可直接用于自动测序，连接，酶切，PCR，标记等。
- HiPure Poly Gel RNA Kit 适合于从各种浓度的变性或非变性的聚丙烯酰胺凝胶中回收 RNA 片段。RNA 回收效率可高达 60-80%，纯化的 RNA 可直接用 RT-PCR，标记等应用。

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。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。

组 成

HiPure Poly Gel DNA Kit

Cat.No.	D2113-01	D2113-02	D2113-03
包装次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GDS	5 ml	20 ml	40 ml
Buffer PBD*	5 ml	10 ml	40 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
Poly-Gel Filter Column	10	50	250
2 ml Collection Tube	20	100	500

HiPure Poly Gel RNA Kit

Cat.No.	R2114-01	R2114-02	R2114-03
包装次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GRS	5 ml	30 ml	60 ml
Buffer RP	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
HiPure RNA Mini Column I	10	50	250
Poly-Gel Filter Column	10	50	250
2 ml Collection Tube	20	100	500

保 质 期

该试剂盒所有的组份必须在保存于室温，有效期为 18 个月。低温放置时 Buffer PBD 或 Buffer RP 可能会有沉淀出来，使用时须加热至 55℃ 水浴使沉淀溶解。

1. HiPure Poly Gel DNA Kit 回收方案

该方案采用离心方法，适合于从变性或非变性的聚丙烯酰胺凝胶中回收 50bp-4kb 的 DNA 片段。以下离心都必须在室温下进行。

该方案需要准备以下材料或工具：

- 小型高速离心机 (~12,000 × g)
- 灭菌的 1.5ml 或 2.0ml 离心管
- 无水乙醇
- 干净的刀片
- 水浴锅温度设至 50℃
- Buffer PBD 使用前加入 2 倍体积的无水乙醇进行稀释，于室温保存。
- Buffer DW2 使用前加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释，于室温保存。

1. 配制合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶，电泳分离 DNA 片段。

2. 用干净的刀片切下含目的 DNA 片段的凝胶块，放置在载玻片上称重。

3. 用另一块载玻片将凝胶块压成小的碎片。把碎片转移至 1.5ml 离心管中。

聚丙烯酰胺凝胶熔点很高，凝胶不能溶解。DNA 主要通过扩散方式从凝胶中游离出来。尽量把凝胶研磨成小碎片，有利于提高 DNA 的回收效率。

4. **按 100mg 凝胶为 100µl 为转换关系。加入 1.5 倍体积的 Buffer GDS。50℃ 振荡温育 30~60 分钟。**

例，100mg 的凝胶块，需加入 150µl Buffer GDS。

5. 取一个 Poly-Gel Filter Column 装在 2ml 收集管中。**把第四步获得混合液/凝胶块全部转移至柱子中。**12,000 × g 离心 1 分钟。

转移混合液/凝胶块时，用剪刀或刀片切去移液枪头的一部分，防止枪头堵塞。

6. 丢去过滤柱，收集并测量滤液的体积。**加入 2 倍体积的 Buffer PBD(已用无水乙醇稀释)至滤液中，涡旋混匀 15 秒。**

若滤液的体积为 250µl，则需加入 500µl Buffer PBD。Buffer PBD 使用前须加入 2 倍体积的无水乙醇进行稀释。

7. 将 HiPure DNA Mini Column I 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。

DNA 柱一次最多装 700 μ l 溶液，混合液超过 700 μ l 时，按第 8 步分次加入。

8. (可选: 混合液>700 μ l) 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**把剩余的混合液转移至柱子中。** 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。** 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer DW2 使用前，须加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释，按瓶子上的标签所示。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。** 12,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。12,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 把柱子套在 1.5ml 离心管中，**加入 15~30 μ l Elution Buffer 至柱子膜中央。**放置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

2. HiPure Poly Gel RNA Kit 回收方案

该方案采用离心方法，适合于从各种浓度，变性或非变性的聚丙烯酰胺凝胶中回收各种 RNA 片段。以下离心都必须在室温下进行。

该方案需要准备以下材料或工具：

- 小型高速离心机 (~12,000 × g)
- 灭菌的 1.5ml 或 2.0ml 离心管
- 无水乙醇
- 干净的刀片
- 水浴锅温度设至 45°C
- Buffer RW2 使用前加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释，于室温保存。

1. 配制合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶，电泳分离 RNA 片段。

2. 用干净的刀片切下含目的 RNA 片段的凝胶块，放置在一块载玻片 (RNase Free) 上称重。

3. 用另一块载玻片(RNase-Free)将凝胶块压成小的碎片。把碎片全部转移至 1.5ml 离心管中。

聚丙烯酰胺凝胶熔点很高，凝胶不能溶解。RNA 主要通过扩散方式从凝胶中游离出来。尽量把凝胶研磨成小碎片，有利于提高 RNA 回收效率。

4. 按 100mg 凝胶 100 μ l 为转换关系。加入 1.5 倍体积 Buffer GRS/DTT，37°C 振荡温育 30 分钟。

使用前，按 1ml Buffer GRS 加入 20 μ l 2M DTT。例，100mg 的凝胶，则需加入 150 μ l Buffer GRS/DTT。

5. 取一个 Poly-Gel Filter Column 装在收集管中。把第四步获得的混合液/凝胶碎片全部转移至柱子中。13,000 × g 离心 1 分钟

转移混合液/凝胶块时，用剪刀或刀片切去移液枪头的一部分，防止枪头堵塞。

6. 丢去过滤柱，测量滤液的体积。加入 1 倍体积 Buffer RP 和 2 倍体积异丙醇至滤液中。涡旋混匀 10 秒。

例，滤液的体积为 250 μ l，则需加入 250 μ l Buffer NP 和 500 μ l 异丙醇。

7. 将 HiPure RNA Mini Column I 套在收集管中。把混合液(第 6 步获得的)转移至柱子中。8,000 × g 离心 30-60 秒。RNA 柱一次最多装 700 μ l 溶液，混合液超过 700 μ l

时，按第 8 步分次加入。

8. (可选: 混合液>700 μ l) 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。把剩余的混合液转移至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 使用前, 须加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释, 按瓶子上的标签所示。
10. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。12,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 把柱子套在 1.5ml 离心管中, **加入 15~30 μ l DEPC 水至柱子膜中央。**放置 2 分钟。
12,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢去柱子, 把 RNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，HiPure 的技术人员也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。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
回收效率低	
凝胶没有压碎	聚丙烯酰胺凝胶在低温不会凝解。尽量压碎凝胶有利于提高回收效率。
洗脱液体积太小	加入洗脱液体积不能太少。
Buffer DW2/RW2 没有加乙醇	Buffer DW2/RW2 使用前必须用无水乙醇进行稀释。
下游应用不理想	
盐污染	加入 Buffer DW2/RW2 至柱子后，静置 5 分钟后再离心。
乙醇污染	Buffer DW2/RW2 最后一步洗涤时，离心时间不能减少。取出柱子必须确保柱子的底部不会接触到滤液。若不小心接触到滤液，倒弃收集管的滤液，把柱子放回收集管中，空柱离心 2 分钟以彻底干燥柱子。
紫外曝光时间太长	DNA/RNA 在紫外灯下曝光时间不要超过 20 秒

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。