

HiPure Gel Pure DNA Maxi Kits B

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 B

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。此外本产品也适合于从 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 100~200mg 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。

产品内容

产品编号	D2111-01B	D2111-02B	D2111-03B
次数	2 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer GDP	30 ml	250 ml	5 x 250 ml
Buffer DW2*	20 ml	50 ml	3 x 50 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Maxi Column C4	2	10	50
50ml Collection Tube C	4	20	100

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(D2111B)可结合 500 μ g 的 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 × 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 50ml 离心管中。**按 1g 凝胶块相当 1ml 体积计算，加入 2 倍体积 Buffer GDP。**50°C 水浴 10~15 分钟，让凝胶块完全溶解。水浴期间，颠倒混匀 2 次加速溶胶。
若凝胶块重量为 2g，则加入 3ml Buffer GDP。若回收 ≤100bp 或 ≥3Kbp DNA 的片段时，加入 3 倍体积 Buffer GDP，处理超过 3KBP 的片段，加溶胶后，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。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。**将 HiPure DNA Maxi Column C4 套在 50ml 离心管中。把 ≤9ml 溶胶液转移至柱子中。**8,000 × g 离心 3 分钟。
4. (可选: 溶胶液超过 9ml) 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 离心管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。8,000 × g 离心 3 分钟。
5. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。**加入 3ml Buffer GDP 至柱子中。静置 2 分钟。**8,000 × g 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。**加入 9ml Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。静置 2 分钟。**8,000 × g 离心 3 分钟。
7. (可选) 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。**加入 9ml Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。**8,000 × g 离心 3 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 离心管中。8,000 × g 离心 15 分钟。

9. 打开柱子的盖子，室温放置 15 分钟以彻底去除乙醇。
10. 把柱子套在 50ml 离心管中，加入 400~600 μ l Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 2 分钟。8,000 \times g 离心 3 分钟。
11. 丢去柱子，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。
若需要获得最高产量，建议重复第 10 步进行第二步洗脱。

实验步骤 2：从反应液中纯化 DNA

该方案适合于从 PCR 产物，酶促反应液，或粗制的 DNA (包括基因组 DNA) 中回收纯化 DNA。该方案可高效地去除各种核苷酸，引物，引物二聚体，盐分子，酶等杂质。DNA 回收效率可高达 80~90%。以下离心都必须在室温下进行。

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 2ml 离心管中。
若样品体积小于 100 μ l，用灭菌水调整至 100 μ l。高浓度的基因组 DNA 最好用灭菌水稀释至 300 μ l，以提高回收效率。
2. **加入等倍体积的 Buffer GDP，**颠倒或涡旋混匀。
注：若需回收小于 100bp DNA 片段或大于 10Kbp 的 DNA 片段，再加入等倍样品体积的无水乙醇至样品中，可以提取回收率。若粗制的 DNA 中含有色素如腐殖酸或多糖等，只需加入等倍体积的 GDP。
3. **将 HiPure DNA 柱子套在收集管中。把混合液转移至 DNA 柱子中。**8,000 \times g 离心 分钟。按实验步骤 1 的第 6~11 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。