

## HiPure DNA Clean Up Kits

DNA 产物纯化试剂盒

### 产品简介

本产品为 DNA 粗制产物，PCR 产物，酶促反应液的 DNA 片段回收纯化提供一条快速的解决方案。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，适合于从 DNA 粗制产物、内切酶切体系、或其它酶促反应液中回收 >17bp DNA 片段。纯化的 DNA 可直接用于测序，连接，酶切，PCR，标记等。

### 产品组份

Cat.No.	D2141-01	D2141-02	D2141-03
纯化次数	10 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GXP	10 ml	40 ml	170 ml
Buffer DW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Columns II	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

### 保存条件

本产品在室温下可以保存 18 个月。

## 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, 最后用低盐缓冲液(如 Buffer TE) 或水, 洗脱出核酸。

DNA 产物和高盐结合缓冲液 Buffer GXP 混匀, 高浓度的胍盐离子会变性或灭活酶分子, 加入适量的无水乙醇, 转移至硅胶柱中吸附 DNA, 而引物, 单核苷酸(dNTP), 小片段的引物二聚体, 以及酶分子等其它杂质则从柱子流出, 不被吸附。柱子再经含乙醇的洗涤液脱盐, 最后用 Elution Buffer 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 (~13,000 x g)
- 1.5ml 离心管(RNase-Free)
- 无水乙醇

## 实验步骤:

### ● 粗制基因组 DNA 回收或 DNA 提取液 (含抑制物、色素、多糖等杂质)

1. 把粗制的基因组 DNA 产物或 DNA 提取液转移至 1.5ml 离心管中, 用灭菌水被补足至 300 $\mu$ l。

从土壤、粪便、水体或其它环境类样品、以及植物真菌等样品中制备的基因组 DNA, 常常含有色素 (腐殖酸)、多糖或其它抑制物, 这些抑制物会引起下游应用的失败。本方案采用高盐介导吸附, 可以高效 DNA 产物中的色素、腐殖酸、多糖、脂质等污染。

2. 加入 450 $\mu$ l Buffer GXP 至样品中, 颠倒 10-15 次, 室温放置 5-10 分钟灭活酶分子。按离心方案或抽滤方案进行操作。

### ● 粗制基因组 DNA 回收 (不含抑制物和色素)

1. 把粗制的基因组 DNA 产物或 DNA 提取液转移至 1.5ml 离心管中，用灭菌水被补足至 250 $\mu$ l。
2. 加入 250 $\mu$ l Buffer GXP，颠倒 6~8 次，室温静置 3-5 分钟。  
加入 Buffer GXP 混匀后，若样品中存在很多不溶解的杂质（有可能是多糖或其它杂质），50 度温育 5-10 分钟，10,000 $\times$ g 离心 3 分钟转移出上清液再按第 3 步进行操作。
3. 然后再加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至样品中，颠倒 10-15 次。按离心方案或抽滤方案进行操作。

#### ● PCR 产物、酶促反应液的 DNA 回收 (>100bp DNA 片段回收)

1. 短暂离心收集 PCR 产物、酶促反应液等样品，用移液枪测量其体积，并转移至灭菌的 1.5ml 离心管中，若样品体积不足 100 $\mu$ l，用灭菌水补足至 100 $\mu$ l。
2. 加入 2 倍体积的 Buffer GXP，颠倒 10~15 次，室温放置 5-10 分钟灭活酶分子。按离心方案或抽滤方案进行操作。

#### ● PCR 产物、酶促反应液的 DNA 回收 (>17bp DNA 片段回收)

1. 短暂离心收集 PCR 产物、酶促反应液，用移液枪测量其体积，并转移至灭菌的 1.5ml 离心管中，若样品体积不足 100 $\mu$ l，用灭菌水补足至 100 $\mu$ l。
2. 加入 1 倍体积的 Buffer GXP，颠倒 6~8 次，室温放置 5-10 分钟灭活酶分子。
3. 加入 2 倍样品体积的异丙醇，颠倒 10~15 次。按离心方案或抽滤方案进行操作。  
例：若 DNA 反应液体积 200 $\mu$ l，则需要加入 200 $\mu$ l Buffer GXP 和 400 $\mu$ l 异丙醇。

#### 离心方案

4. 将 HiPure DNA Mini Column II 套在收集管中。把  $\leq 700\mu$ l 混合液转移至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
5. (可选：总体积超过 700 $\mu$ 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。
6. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 700 $\mu$ l Buffer DW2 至柱子中。12,000  $\times$  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700 $\mu$ l Buffer DW2 至柱子中。**12,000  $\times$  g 离心30~60 秒。
8. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**12,000  $\times$  g 离心2分钟。
9. **把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 15~30 $\mu$ l Elution Buffer 至柱子膜中央。**放置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。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 9 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 $^{\circ}$ C，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。

### 负压抽滤方案

4. **连接好真空泵和抽滤盒，把柱子插到抽滤盒的接口处。转移混合液至柱子中，打开真空泵进行抽滤。**
5. **溶液过滤完毕后，加入 700 $\mu$ l Buffer DW2 至柱子中。**  
Buffer DW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。
6. **溶液过滤完毕后，加入 700 $\mu$ l Buffer DW2 至柱子中。溶液过滤完毕后，关闭真空泵。**
7. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**12,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
8. **把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 15~50 $\mu$ l Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。**放置 2 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。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 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 $^{\circ}$ C，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。