

HiPure Gel Pure DNA Nano Kit

凝胶 DNA 痕量回收试剂盒

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。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 Nano Kit 采用痕量柱，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。

产 品 组 份

产 品 编 号	D2010-01	D2010-02	D2010-03
纯化次数	20 Preps	50 Preps	250 Preps
Buffer GDP	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer DW2 *	6 ml	10 ml	50 ml
Elution Buffer	5 ml	5 ml	30 ml
HiPure DNA Micro Columns	20	50	250
2 ml Collection Tubes	20	50	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℃使沉淀溶解。

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 ($\sim 12,000 \times g$)
- 水浴锅温度设至 $50\sim 55^{\circ}\text{C}$

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 2 ml 离心管中, 按 100mg 凝胶块相当 100 μl 体积计算, 加入等倍体积 Buffer GDP, $50\sim 55^{\circ}\text{C}$ 水浴 7~10 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 200mg, 则加入 200 μl Buffer GDP。本产品提供的 Buffer GDP, 只足够处理 300mg 凝胶, 处理更大量的凝胶时, GDP 可以另外订购。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。将 HiPure DNA Nano Column 套在 2ml 离心管中。把 $\leq 700\mu\text{l}$ 溶胶液转移至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 1-3 分钟。
若凝胶超过 300mg 时, 延长离心时间至 3 分钟。
4. 倒弃滤液, 把柱子套回 2ml 离心管中。加入 100 μl Buffer GDP 至柱子中。静置 1 分钟。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子套回 2ml 离心管中, 加入 600 μl Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 1 分钟。

Buffer DW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。

6. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。12,000 × g 离心 2 分钟。
7. 把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 7~15μl 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 7 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洗脱，以获得高浓度的 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

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 1.5ml 离心管中。

若样品体积小于 100μl，用灭菌水调整至 100μl，基因组 DNA 最好用灭菌水稀释至 300μl。

2. 加入等倍体积的 Buffer GDP 至样品，颠倒或涡旋混匀，静置 1-3 分钟。

若需回收<100bp 片段，再加入 2 倍样品体积的异丙醇至样品中，混匀。

3. 将 HiPure DNA Column 套在收集管中，转移全部混合液至柱子中。12,000 × g 离心 60 秒。

4. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中，加入 600μl Buffer DW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。12,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer DW2 使用前，按瓶子上的标签指示，用无水乙醇进行稀释。

5. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。12,000 × g 离心 2 分钟。

6. 把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 7~15μl 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 6 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

至柱子进行第二次洗脱，以获得高浓度的 DNA。

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

常见问题

1. 回收效率低

- **凝胶未充分溶解：**溶胶时，50~55℃ 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℃。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℃。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。