

HiPure Gel Pure DNA Mini Kit

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒

产 品 组 份 : HiPure Gel Pure DNA Mini Kit

产 品 编 号	D2111-01	D2111-02	D2111-03
次数	20 Preps	100 Preps	250 Preps
Buffer GDP	15 ml	80 ml	200 ml
Buffer DW2*	6 ml	2 x 20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Columns I	20	100	250
2 ml Collection Tubes	20	100	250

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°C 使沉淀溶解。HiPure DNA Mini Column(D2111)可结合 15 μ g 的 DNA。

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。

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 \times g)
- 水浴锅温度设至 50~55 $^{\circ}$ 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 1~3 倍体积 Buffer GDP。**50~55 $^{\circ}$ 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，则加入 200~600 μ l Buffer GDP。凝胶浓度超过 2.0%时，加入 2~3 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。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。**将 HiPure DNA Mini Column 套在 2ml 离心管中。把 \leq 700 μ l 溶胶液转移至柱子中。**12,000 \times g 离心 30~60 秒。
4. (可选: 溶胶液超过 700 μ l) 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。

5. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer GDP 至柱子中。静置 1 分钟。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 600 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。
7. (可选) 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。加入 600 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。
8. 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。12,000 \times g 离心 2 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 分钟以彻底去除乙醇。
9. 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。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。回收大于 3KB 以上的片段时，最好把 Elution Buffer 预热至 55 $^{\circ}$ C。

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 \times g 离心 30~60 秒。按实验步骤 1 的第 6~9 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。