

HiPure Gel Pure DNA Maxi Kit

凝胶 DNA 大量纯化试剂盒

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。试剂盒采用大型的硅胶柱纯化技术，结合力高达 0.5mg，可以在 30~50 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。

产品内容

产品编号	D2111-01B	D2111-02B	D2111-03B
次数	2 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer CL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GDP	30 ml	150 ml	3 x 250 ml
Buffer GEP	30 ml	30 ml	150 ml
Buffer DW2*	10 ml	25 ml	3 x 50 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Maxi Column C4	2	10	50
50ml Collection Tube C	2	10	50

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°C 使沉淀溶解。HiPure DNA Maxi Column C4(D2111B)可结合 500µg 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。
- 大型高速离心机 (~8,000 rpm)
- 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。称取凝胶块的重量，把凝胶块处理成小碎片并转移至合适的离心管中。
2. 按 1g 凝胶块相当 1ml 体积计算，加入 1 倍体积 Buffer GDP，颠倒混匀，45~55°C 水浴 10~15 分钟直到凝胶块完全溶解。水浴期间，颠倒混匀数次加速溶胶。
若凝胶块重量为 2g，则加入 2ml Buffer GDP。若回收 ≤100bp 或 ≥3Kbp DNA 的片段时，加入 2 倍体积 Buffer GDP。处理基因组 DNA 时，加入 3 倍体积 Buffer GDP，完全溶胶后，再加入 1 倍凝胶体积的异丙醇，立即颠倒混匀再按第三步进行操作。
3. 将 HiPure DNA Maxi Column C4 在 50ml 收集管 C 中，转移 2.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 3 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。
Buffer CL 中含有 NaOH，可以激活柱子的吸附力。
4. 加入 5ml 灭菌水或超纯水至柱子中，8,000 rpm 离心 3 分钟。
5. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。把 10~15ml 溶胶液转移至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。
纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 2~3 次过柱。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 14 ml，以防产生漏液现象。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
6. (可选: 溶胶液超过 10ml) 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 2.5ml Buffer GEP 至柱子中，静置 3 分钟。

8,000rpm 离心 3 分钟。

8. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 5ml Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。静置 2 分钟。8,000rpm 离心 3 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。

9. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 5ml Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。8,000rpm 离心 15 分钟。**

10. **取出柱子，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子滤膜。**倒弃收集管中滤液，加入适量超纯水或灭菌水清洗离心管，倒弃全部液体，室温放置晾干备用。

11. **把 DNA 柱子套在收集管中，加入 500~800 μ l Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 2~5 分钟。8,000rpm 离心 3 分钟。丢去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。**

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，以获得高浓度的 DNA。

回收大于 10Kbp 基因组 DNA，建议加入更多洗脱液并延长柱子的浸泡时间至 5 分钟。

Elution Buffer 成分为 10mM Tris,pH8.5，可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。由于滤膜存在吸水性，会有~0.1ml 洗脱液损失，建议洗脱体积不要低于 0.5ml。

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 2ml，用灭菌水调整至 2ml。高浓度的基因组 DNA 最好用灭菌水稀释至 3ml，以提高回收效率。

2. **加入等倍体积的 Buffer GDP，颠倒混匀 10-15 次，室温放置 3-5 分钟灭活酶物质。**

若需回收小于 100bp DNA 片段、大于 10Kbp DNA、或粗制的基因组 DNA 时，加入等倍体积的 Buffer GDP 颠倒混匀后，再加入等倍样品体积的无水乙醇，可以提高回收率。例：2ml 粗制

的基因组 DNA 产物，加入 2ml Buffer GDP，颠倒混匀后，再加入 2ml 无水乙醇颠倒混匀 10-15 次。若粗制的 DNA 中含有色素如腐殖酸或多糖等，只加入等体积的 GDP，不要加入乙醇。若回收的 DNA 产物总量超过 400ug 时，建议加入等体积的 Buffer GDP 颠倒混匀后，再加入等倍样品体积的异丙醇，混匀后过柱，可以提高吸附柱的结合力至 1mg。

3. 将 HiPure DNA Maxi Column C4 在收集管中，转移 2.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 3 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。

Buffer CL 中含有 NaOH，可以激活柱子的吸附力。

4. 加入 5ml 灭菌水或超纯水至柱子中，8,000 rpm 离心 3 分钟。
5. 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 收集管中。把 ≤10ml 溶胶液转移至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。
6. (可选：溶胶液超过 10ml) 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 收集管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。

7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 5ml Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。静置 2 分钟。8,000rpm 离心 3 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。

8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 5ml Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。8,000rpm 离心 15 分钟。

9. 取出柱子，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子中的滤膜。倒弃收集管中的滤液，加入适量超纯水或灭菌水清洗收集管，倒弃液体后室温放置晾干备用。

10. 把柱子套回 50ml 收集管中，加入 500~800 μ l Elution Buffer 至柱子膜中央。放置 2~5 分钟。8,000rpm 离心 3 分钟，丢去柱子，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

若回收大于 5KB 以上的片段时，最好把 Elution Buffer 预热至 55~65 $^{\circ}$ 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膜中央进行第二次或第三次洗脱，以获得高浓度的 DNA。

回收大于 5Kbp DNA 片段或基因组时，建议加入更多洗脱液并延长柱子的浸泡时间至 5 分钟。Elution Buffer 成分为 10mM Tris,pH8.5，可以用 Buffer TE 或灭菌水(pH>6.5)代替。由于滤膜存在吸水性，会有 ~0.10ml 洗脱液损失，建议洗脱体积不要低于 0.5ml。