

HiPure PCR Pure Maxi Kit

DNA 大量纯化试剂盒

产品简介

本产品采用大量硅胶柱纯化方案，适合于从 1~10ml PCR 产物、酶促反应液、粗制基因组 DNA 中回收各种大小的 DNA 片段。纯化的 DNA 可直接用于自动测序，连接，酶切，PCR，标记等。

产品组份

Cat.No.	D2123-01	D2123-02	D2123-03
Package	2 Preps	10 Preps	50 Preps
Buffer CL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GWP	30 ml	200 ml	550 ml
Buffer DW2*	10 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	5 ml	20 ml	60 ml
HiPure DNA Maxi Column C4	2	10	50
50 ml Collection Tube C	4	20	100

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。

PCR 产物和高盐结合缓冲液 Buffer GWP 和异丙醇,混匀,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 Taq 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。
- 角度高速离心机 (8000rpm)

实验步骤

1. 短暂离心 PCR 产物、酶促反应产物、或粗制基因组 DNA，转移 1-10ml 产物至合适的离心管中。
2. 加入 1 倍 Buffer GWP，颠倒混匀 6-8 次，室温放置 10 分钟灭活酶分子。
3. (可选)加入 1 倍样品体积的无水乙醇至样品中，颠倒混匀 6-8 次。
若粗制的基因组 DNA 中含有色素如腐殖酸或多糖等，省略这一步，不要加入乙醇。
若需要充分去除 PCR 的短片段 (<100bp)，省略这一步，不要加入乙醇。
加入乙醇有利于提高回收率和柱子载量，不加入乙醇时，柱子的载量为 0.5mg，加入乙醇后柱子的载量为 1.0mg。
4. 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。
5. 加入 5ml 灭菌水或超纯水至柱子中，8,000 rpm 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 收集管 C 中，把 10~15ml 混合液转移至柱子中。
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。
7. 倒弃滤液，把柱子套回 50ml 离心管中。把剩余混合液转移至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。
8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管 C 中。加入 8ml 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。
9. 取出柱子，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子滤膜。倒弃离心管中的滤液，加入适量超纯水或灭菌水清洗离心管，倒弃全部液体，室温放置晾干离心管中。
10. 把 DNA 柱子套在 50ml 收集管 C 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℃。

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，最佳的洗脱体积为 0.7-0.9ml。

常见问题

1. 回收效率低

- **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%)。
- **结合液加入体积不足：**Buffer GWP 的体积是样品体积的 1 倍。
- **样品含有表面活性剂：**处理含表面活性剂的酶促反应液时，不要省略乙醇。

2. 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。
- **引物二聚体去除不干净：**当引物二聚体超过 100bp 时，建议使用 MagPure A3 XP(Cat.No. BP-5)进行回收。通过调整 MagPure A3 XP 与产物体积比例，可高效去除 100~300bp 的杂带。