

High Pure PCR Cleanup Micro Kit 创新灵活的核酸纯化产品

Nina Lassonczyk, Constanze Stadler, Jenna Liedtke 和 Horst Donner*

罗氏应用科学部, 匹兹堡, 德国

*联系作者: michael.hoffman@roche.com

High Pure 系列的手动核酸分离纯化试剂盒长期以来一直都获得科学研究界的认可。High Pure系列的产品涵盖了对基因组RNA和DNA、质粒DNA及一系列反应产物的纯化;我们的产品设计研发的理念是提供优化的反应溶液以适用于多种不同样本的纯化,减少目前许多生物学实验室所存在的需要配备多个核酸纯化试剂盒以满足不同样本纯化需要的现状。

简介

High Pure Micro 纯化模式是在 06 年与 High Pure FFPE RNA Micro Kit产品一同面世的。该纯化模式可以让用户使用更小的洗脱体积 (> 10 µl) 获得更高浓度的核酸分离纯化产品,缩短操作时间同时避免可能会对样本造成影响的浓缩过程。

High Pure PCR Cleanup Micro Kit 产品特性

High Pure PCR Cleanup Micro Kit 添加了几乎在所有分子生物学实验室常规核酸纯化应用,进一步拓展了 High Pure 系列的产品线。PCR 产品以及来自酶聚合反

商可以为PCR产物、标记产品以及胶纯化分别提供不同的纯化试剂产品,罗氏的一个 High Pure PCR Cleanup Micro Kit 产品就可以满足所有这些不同样本的纯化需要。产品包括有二个操作应用:一个用于纯化 100 µl 的液体样本;另一个用于纯化至多 100 mg 的琼脂糖胶块。

High Pure PCR Cleanup Micro Kit 提供独立包装的结合缓冲液(binding buffer)和结合增强液 (binding enhancer solution), 让该产品更具灵活性。两种组分可各自混合以实现针对不同结合力和结合特性的调整。其中结合增强液的用量直接与核酸在纯化柱上结合过程的亲和力相关,同时与纯化核酸的产量和大小相关。其不同应用中的重要性变化以及推荐的使用量参考Table 1。

在纯化核酸标记产品或是无需去除引物二聚体的 PCR 产物时, 推荐使用 200 µl 的结合增强液获得最大的结合力 (Table 1, option 1)。对于要求去除小片段的寡聚核酸例如某些简单的引物,300 µl的结合缓冲液和 100 µl的结合增强液就纯化核酸的产量和纯度来说是更加优化的组合比例 (Table 1, option 2)。而对于纯化用以测序的 PCR 产物时, 避免使用增强液则可以避免

Table 1: Application selection guide.				
For 100 µl liquid sample or 100 mg agarose gel		Option 1	Option 2	Option 3
		200 µl binding buffer+200 µl binding enhancer(40%)	300 µl binding buffer+100 µl binding enhancer(20%)	400 µl binding buffer
Purification of liquid sample,100 µl	Laqbeling or other reaction products 100 bp to 5 kb	+		
	PCR products 100 bp to 5 kb	+		
	DNA fragments for sequencing			
Purification from agarose gel,100 mg	DNA Fragments 100 bp to 5 kb		+	+
Removal of low molecular weight DNA	Primer up to 25 bases			
	Primer-dimer up to 70 bp		+	+

应、标记和修饰反应的核酸都可以在 micro 水平上进行纯化。High Pure PCR Cleanup Micro Kit 基于公认的旋转离心柱的方法,利用结合、清洗和洗脱步骤分离纯化核酸;该方法更加快速、简便和易操作,被成功使用的历史已经超过10年。尽管目前有一些商业化产品的供应

引物或是引物二聚体的污染,事实证明即使是很少量的引物污染,也可对测序结果造成影响。因此在不加入结合增强液的情况下,可以最大限度的降低小分子核酸 (例如,引物或是引物二聚体) 的存在 (Table 1, option 3)。

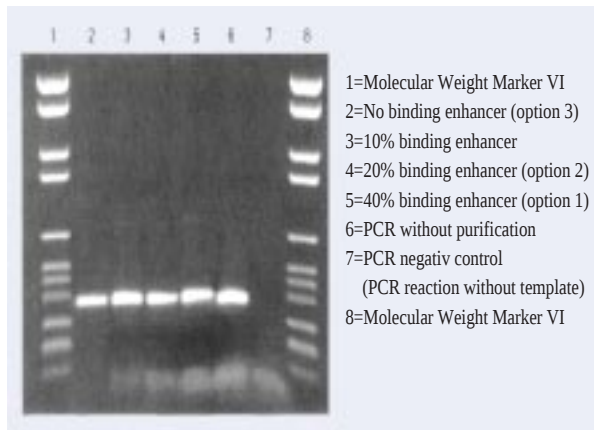
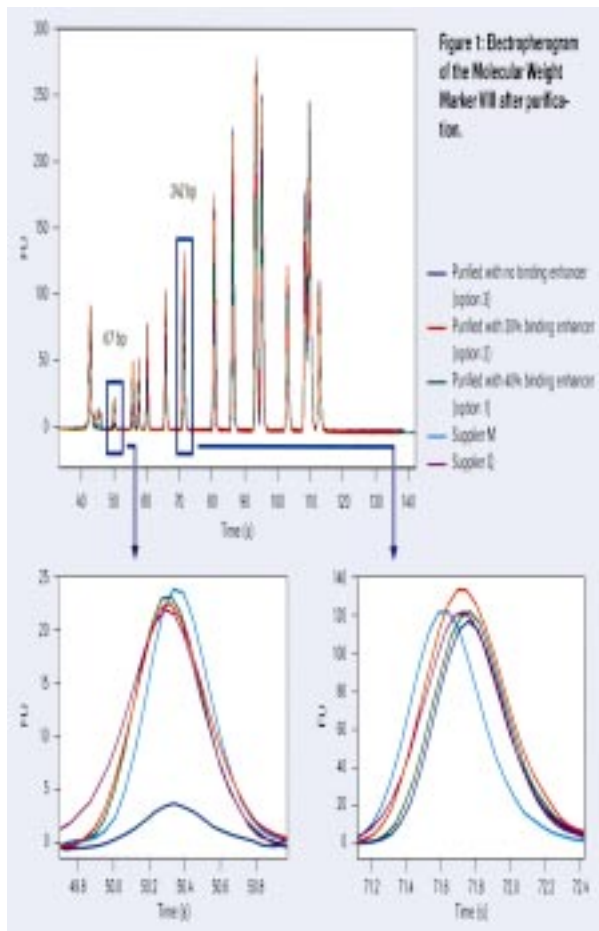


Figure 2: Agarose gel electrophoresis and ethidiumbromide staining of 341 bp PCR products.

Table 2: Yield of PCR fragments isolated with increasing amounts of binding enhancer.

Binding conditions	260/280 ratio	Yield (ug)
No binding enhancer (option 3)	1.9	0.6
10% binding enhancer	1.9	0.9
20% binding enhancer	1.8	1.2
40% binding enhancer	1.8	1.2

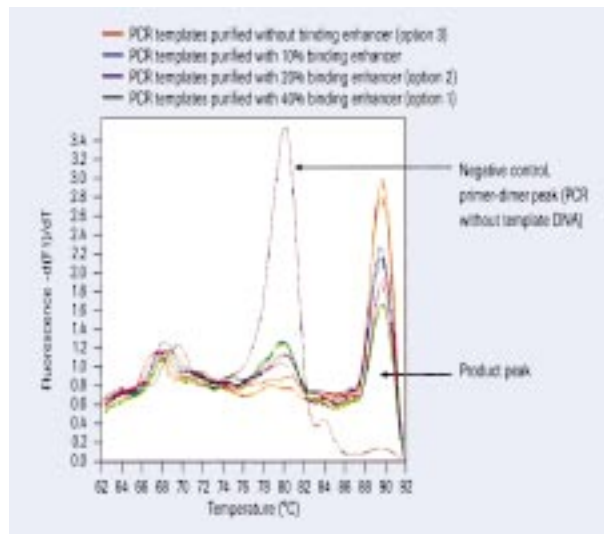


Figure 3: Melting curve analysis after the last PCR cycle using a LightCycler 1.5 Instrument.

Table 3: Purification of an 1,100 bp cDNA fragment in combination with depletion of Cy5 dUTP.

Sample ID	Yield (ug)	260/280 ratio	Cy5 dye (mmol)
Supplier Q	0.1	1.9	not detectable
Supplier M	1.1	2	0.22
High Pure PCR Cleanup Micro Kit + 20% binding enhancer (option 2)	1.8	2.1	not detectable
High Pure PCR Cleanup Micro Kit + 40% binding enhancer (option 1)	1.9	2.1	0.01

应用实例

为了说明High Pure PCR Cleanup Micro Kit的性能，我们将3 μ g的Molecular Marker VIII (19 bp-114 bp 的双链DNA片段)与Fast Start HiFi PCR反应缓冲液混合后，在逐级增加的结合增强液用量的情况下，用High Pure PCR Cleanup Micro Kit进行纯化。为了进一步分析纯化后效果，取等量的纯化后样本使用DNA 1000 chip在Bioanalyzer (Agilent, USA)上进行毛细管凝胶电泳。

Figure 1显示了使用逐级提升结合增强液浓度的High Pure PCR Cleanup Micro Kit纯化的Molecular Marker VIII在Bioanalyzer上的电泳分析结果，同时对另外两个市面上其他供应商提供纯化产品结果进行了比较。结果显示，只有没有加入结合增强液的High Pure PCR Cleanup Micro Kit可以很好的去除67 bp大小的片段。而对于242 bp大小片段的纯化，则所有的产品纯化效果表现都很相似。排除一定大小的片段和去除小分子核酸分子，对PCR的纯化效果有重要的影响。每一次的PCR反应中都需要使用人工合成的DNA分子做为引物。虽然通过反应条件的优化，可以提升反应的特异性、

扩大产量,但所有的最终体系中都不可避免地有反应剩余的引物和不定量的引物二聚体的存在。

做为测试,我们使用Taq DNA Polymerase扩增341 bp的tPA基因。将反应产物混合后使用High Pure PCR Cleanup Micro Kit加入不同浓度的增强液进行纯化后,使用NanoDrop进行OD检测。为了进一步分析250 ng的PCR纯化产品,取纯化样品在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳。PCR产物的电泳图以及产量分见Figure 2和Table 2。可以看到,结合增强液用量的增加可提高PCR产物中DNA片段的回收率。而这种回收效率提升则又会主要地影响小分子PCR产物的纯化(例如引物二聚体)。

加大纯化过程中使用的结合增强液的用量,可以提高PCR反应混合体系中的DNA片段的回收效率。然而如图2所示,一定回收效率的提高往往会伴随更多量的引物聚合体与PCR产物的一同被纯化。为了研究残留的PCR反应组份对后继应用的影响,使用等量的PCR纯化产物做为模板在LightCycler® 1.5上再次进行PCR扩增反应。所有的反应系统中都包括了之前普通PCR扩增使用的引物,并进行了同步的重复实验(结果见Figure 3)。其中阴性样本(不含有模板DNA)的结果显示了很高的引物二聚体峰,同时在tPA基因产物的位置上没有峰值出现。以不同浓度结合增强子条件下的纯化产物为模板的扩增结果则显示,引物二聚体量增加的同时伴随着特异性tPA基因PCR产物的降低。这是由于定量PCR扩增使用的模板中引物二聚体与目的片段共纯化的原因。

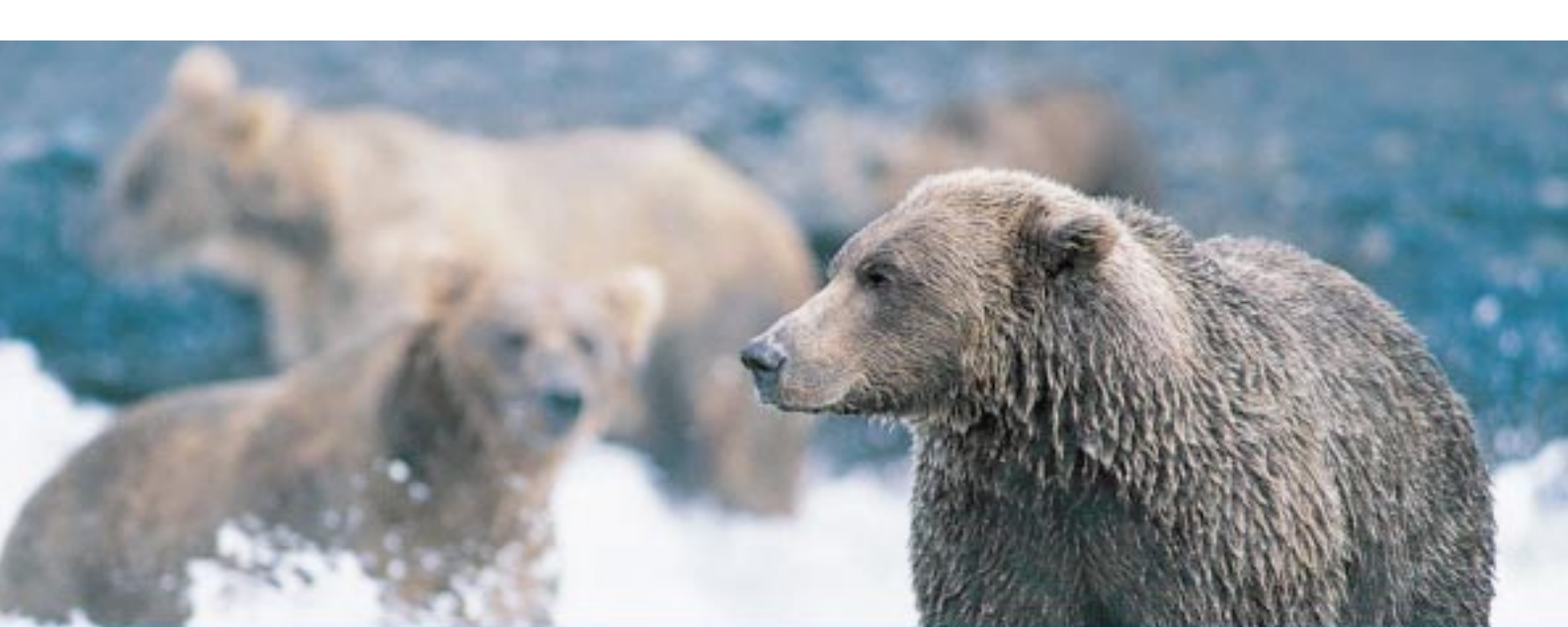
而对于另外一些应用,小片段的去除相对于纯化的产量和反应组份存在并不是那么重要,例如酶反应、非掺入核苷酸的去除以及标记。为了衡量High Pure PCR Cleanup Micro Kit在这些应用中的表现,我们用1微克1100碱基长度的mRNA片段,使用Microarray cDNA Lableing Kit进行反转录。为了测试对标记核酸

的清除能力,在每个纯化样品中加入2.2 nmol的Cy5标记的dUTP。反应产物使用High Pure PCR Cleanup Micro Kit分别在20%和40%结合增强液存在的情况下参照操作指南进行纯化(option 2和option 1),所得结果与另外两个其他供应商提供的纯化产品进行比较;对掺有Cy5标记的dUTP反应产物的纯化结果Table 3所示。其中High Pure PCR Cleanup Micro Kit与其他的两个产品相比,显示出了最高的得率。同时纯化产物中Cy5标记的dUTP量也是低于(20%结合增强液存在的情况下)或是接近(40%结合增强溶液存在的情况下)NanoDrop系统可检测的最小极限。

结论

洗脱体积最小可到10 µl,每次最大可纯化20 µg的DNA,使得High Pure PCR Cleanup Micro Kit可以满足更多实验操作的需要。此外,试剂盒中提供的单独包装广谱结合缓冲液和结合增强液可大大提高纯化的灵活性。操作人员可以通过调整纯化过程中使用的结合增强液的浓度,变换纯化过程中去除片段的大小。在不加入结合增强液的情况下,可以有效的去除引物二聚体和小分子的DNA片段。相反,使用40%浓度的结合增强液则可在保证纯度的情况下获得更高回收效率,如从cDNA合成混合物中去除Cy5标记的dUTP标记的实验所示。以往实验人员由于纯化样本的差别,不得不使用不同纯化原理的试剂盒,进行不同的纯化流程操作;现在,只需要一个High Pure PCR Cleanup Micro Kit就可满足几乎所有分子生物实验中的纯化需要。

产品名称	包装规格	序列号
High Pure PCR Cleanup	50 purifications	04 983 955 001
Micro Kit	200 purifications	04 983 912 001



www.roche-applied-science.com



转染试剂
“换装”大行动
详情请登陆

www.ras-biosino.com

FuGENE® HD 转染试剂

**Measure the results of your transfection,
not your transfection reagent.**

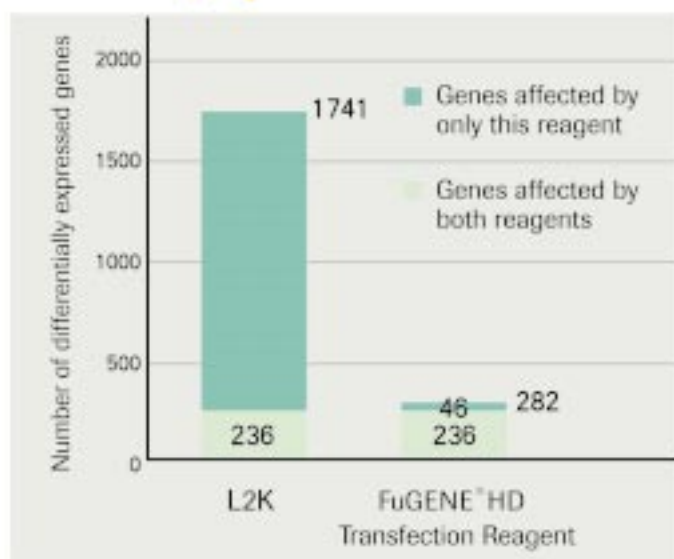


Figure 1. Minimize off-target effects by using FuGENE® HD Transfection Reagent.
FuGENE® HD Transfection Reagent or a reagent from another supplier (L2K) was used to transfect MCF-7 cells (RXCC® HTB-22®). Subsequent microarray expression profiling experiments demonstrated that L2K significantly altered the expression levels of six times more genes than FuGENE® HD Transfection Reagent. (View the complete article online in *Biochemistry* (2006) 4 at www.roche-applied-science.com/publications/Biochemistry.htm)

更多的产品信息及成功转染的细胞株列表：
www.roche-applied-science.com/fugene

罗氏诊断产品(上海)有限公司

罗氏应用科学部

上海市淮海中路1045号
淮海国际广场12楼
邮编: 200031
Tel: +86 21 2412 1000
Fax: +86 21 2412 1188
邮箱: china.as@roche.com

北京办事处
北京市东长安街1号东方广场
东方经贸城中二办公楼六层09室
邮编: 100738
Tel: +86 10 8515 4100
Fax: +86 10 8515 4188

广州办事处
广州市环市东路403号
广州国际电子大厦2701室
邮编: 510095
Tel: +86 20 8732 3050
Fax: +86 20 8732 3048



继堪称转染试剂精粹的FuGENE® 6之后, 罗氏应用科学部推出全新的FuGENE® HD 非脂质体转染试剂, 带来更高效、可靠的转染实验结果, 为您的实验助一臂之力!

• 更高的转染效率

应用领域广泛, 显著提升其他目前现有转染试剂难转染的细胞株的转染效率, 例如: RAW264.7, MCF-7, PC-3, Hela, MA-10, HepG2, SH-SY5Y, A7r5, ST0, SCC-61, SQ20B, T98G等等

• 更低的细胞毒性

避免和减小转染试剂自身对细胞造成的脱靶效应, 有助获得更多可靠的生理学数据 (Fig.1)

• 更多的蛋白表达

通过调节用量可显著提高转染后的目的蛋白表达水平

• 更便捷的实验操作

经 0.1µm 过滤灭菌的非脂质体转染试剂, 不含任何动物成分来源的, 在100%的血清中仍有活性

• 更大的实验通量

简便的操作步骤同时适用多种细胞, 室温状态下依然稳定满足大通量的实验操作需要