DNA 凝胶回收试剂盒

产品组分

组分	N1071	N1072	N1073
溶液 BD	20 ml	40 ml	80 ml
溶液 PE	15 ml	15 ml×2	20 ml×2
溶液 Eluent	2.5 ml	5 ml	10 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

- 溶液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 4 稀释，即含 80%乙醇。
- 溶液 BD 中含有变性剂，请不要直接接触皮肤。
- 上述产品组分均可单独购买，详见产品索引。

产品说明

本产品采用了经典的硅胶膜技术，用于从TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段（50 bp-40 kb）。其纯化原理是含有目的片段的琼脂糖凝胶溶解后，硅胶膜柱高效可逆地吸附体系中的 DNA 片段（高盐、低 pH 值），蛋白及其它杂质不被吸附而被除去，被吸附的DNA 片段在低盐、高pH 值条件下再被洗脱纯化。一次可回收30μg 高纯度 DNA 片段，此 DNA 片段可直接用于各种酶促反应等。

质量控制

从 1 % TAE琼脂糖凝胶中纯化50 bp、1,000 bp、10,000 bp 的 DNA 片段。

保存条件

室温保存 2 年。

注意事项----------

- 溶液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入4 倍体积的无水乙醇，即 15 ml 溶液 PE 中加入 60 ml 无水乙醇，20 ml 溶液 PE 中加入 80 ml 无水乙醇，使用后立即盖紧盖子。
- 本产品对电泳使用的 Agarose 种类没有严格限制，可以使用普通 Agarose。为了保证回收 DNA 的质量和 DNA 回收效率，希望使用高纯度的 Agarose，但没有必要一定要使用低熔点的 Agarose 等。
- 电泳时请使用新鲜配制的 TAE 电泳缓冲液，以免影响电泳及回收效果。
- 请适当延长电泳时间，在条带分离清晰后进行切胶回收，以免回收到多余杂带。
- 为提高 DNA 回收收率，切胶时应尽量除去多余的胶块。
- 本试剂盒纯化柱的 DNA 吸附能力强。但如果 DNA 浓度小，或 DNA 初始量少，回收率将会偏低。
- **溶液 Eluent（10 mM Tris-HCl, pH 8.5）中不含 EDTA，其收集的 DNA 片段可直接用于各种酶促反应等，不会影响后续试验。**
- **为了保证回收效率，请不要使用未调整pH 值的超纯水洗脱目的片段。**
- 请严格按照操作步骤操作。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

操作步骤----------

1 切取含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶条带。

- 尽量切除不含有目的 DNA 部分的凝胶，减少凝胶体积，提高 DNA 回收率。
- 切胶时，请使用长波长 UV（360 nm）光盒。且不要将 DNA 长时间暴露在紫外灯下，以防 DNA 损伤。

2 称取凝胶的重量近似地确定其体积。

- 凝胶重量的称量方法：取 1.5 ml 离心管电子天平称初质量，切胶装在离心管后称终质量，两者差即为胶的质量。不同厂家离心管的重量可能有差异，因此，每个离心管的重量需单独称量。

3 按照每 100 mg 琼脂糖凝胶对应 100 μl 溶液 BD 的比例，向离心管中加入溶液 BD。

4 55 ℃-65℃水浴 7-10min，直至凝胶完全溶化。期间需要振荡混合 3 次。

- 琼脂糖必须完全融化，以免堵塞柱子，严重影响 DNA 片段的回收效率。
- 如果总体积大于 500 μl，可适当增加溶胶时间。
- 若此时溶液变红，可加 10 μl 3M NaAC（pH 5.2）。

5 将步骤 4 所获溶液置于 DNA 纯化柱中，静置 2min。

- 胶块完全溶解后最好将胶溶液温度降至室温再上柱，因为纯化柱在较高温度时结合 DNA 的能力较弱。

6 12,000 rpm 离心 1min。若溶液量大于 DNA 纯化柱的容积，可分两次离心，弃滤液。

- 此时 DNA 片段被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。

7 加入 500 μl 溶液 PE。12,000 rpm, 离心 1min，弃滤液。

- 溶液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1: 4 稀释，即含 80%乙醇。
- 此步骤的作用是将硅胶膜上吸附的蛋白、盐等杂质洗脱，以获得高质量 DNA 片段。

8 加入 500 μl 溶液 PE。12,000 rpm, 离心 1min，弃滤液。

9 12,000 rpm 离心 3min，以彻底去除纯化柱中的液体。

- 此步骤的作用是去除残留乙醇，避免残留乙醇影响后续酶促反应。同时也利于 DNA 片段的充分溶解。

10 将离心柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱的中央处，悬空滴加 30-100 μl 溶液 Eluent（60℃预热），静置 2min。12,000 rpm 离心 1min，管底即为目的 DNA 片段。贮存于-20℃。

- **溶液 Eluent 可用无菌双蒸水代替，但其 pH 需为 8.0-8.5**，加入体积视 DNA 目的片段的多少、用户对目的片段浓度要求而定。
- 对溶液 Eluent 60℃预热，会提高提取 DNA 目的片段的产量。

Q&A----------

问：常用的 DNA 浓度及纯度检测方法有哪些？

答：回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。

琼脂糖凝胶电泳通过对比定量的 Marker 来定量浓度；

紫外分光检测 OD260/280 比值，OD260/280 比值在 1.7-1.9 之间说明所得 DNA 纯度较好，如果洗脱时不使用溶液 Eluent 而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但不表示纯度低。

问：长片段回收时应注意哪些问题？

答：当 DNA 片段长度较长（5 kb 以上）时，回收效率会有所下降，这是 DNA 切胶回收时的常见现象。此时建议按以下方法解决问题：

1 适当增加待回收 DNA 样品的点样量；

2 由于长片段 DNA 不易从树脂上洗脱下来，建议洗脱两次，可以提高洗脱效率；

3 减少操作过程中对长片段 DNA 的物理损伤，如混合振荡操作不要过于剧烈，切胶时不要将 DNA 长时间暴露在紫外等下。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn