

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	15ml	15ml×2	20ml×3
溶液Eluent	2.5ml	5 ml	10ml
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。
- 请严格按照操作步骤操作。

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 称取凝胶的质量近似地确定其体积。
 - 凝胶质量的称量方法：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。
 - 不同厂家离心管的质量可能有差异，因此，每个离心管的质量需单独称量。
- 3 按照每100 mg琼脂糖凝胶对应100 μ l溶液BD的比例，向离心管中加入溶液BD。
- 4 55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C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 μ l，可适当增加溶胶时间。
 - 若此时溶液变红，可加10 μ l 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 μ l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 μ l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 μ l溶液Eluent（60 $^{\circ}$ C预热），静置2min。12,000 rpm离心1min，管底即为目的DNA片段。贮存于-20 $^{\circ}$ C。
 - 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。
 - 为提高回收效率，可再重复操作一次步骤9和10。
 - 对溶液Eluent 60 $^{\circ}$ C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OD_{260/280} 比值，OD_{260/280} 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长时间暴露在紫外灯下。