

琼脂糖凝胶 DNA 微量回收试剂盒

一、产品简介

本试剂盒采用硅胶膜选择性吸附DNA的方法回收DNA。温和的融胶液(Buffer GM)能避免DNA在高温下发生脱氨、脱嘌呤、末端水解和变性,保持DNA完整的生物学活性。

适合从 TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶中回收多至 4 µg DNA (50 bp-15 kb), 回收率为 60-90%, 最小洗脱体积为 15 µl; 也适合从各种酶反应液中回收浓缩 DNA。纯化的 DNA 适用于酶切、连接、PCR 和测序等分子生物学实验。

有效回收量与起始样品量

本试剂盒有效回收量为0.5-4 µg双链DNA。起始目的DNA量偏高或偏低都会降低回收率。

PCR产物估算方法: 通常PCR体系中上下游引物浓度各0.2 µM, 理想条件下50%引物转化为目的产物, 即0.1 µM;

100 bp目的产物为6.6 ng/µl; 500 bp目的产物为33 ng/µl; 1 kb目的产物为66 ng/µl, 以此类推。

质粒酶切产物估算方法: 目的DNA量= 起始质粒DNA量 × 酶切后目的DNA长度 ÷ 质粒DNA长度

质粒DNA的纯度、构型和酶切效率会影响起始DNA量的估算。

二、试剂盒组成和储存

| 组成内容 | DK402-01 (50 次) | DK402-02 (200 次) |
|-------------------------|-----------------|------------------|
| Buffer GM [□] | 18 ml | 80 ml |
| Buffer WB3 [§] | 16 ml | 65 ml |
| DNA 吸附柱-A4 | 50 个 | 200 个 |
| 收集管 | 50 个×2 | 200 个×2 |
| 1.5ml 离心管(用于洗脱) | 50 个 | 200 个 |
| TE [*] | 15 ml | 30 ml |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 |

[□]Buffer GM: 储存温度低于10℃时, 可能会析出不溶物, 需37-56℃加热溶解; 不能使用更高温度加热, 不然试剂瓶会变形。

[§]Buffer WB3: 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

^{*}TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% NaN₃, pH 8.0(25℃)。

所有组成成分于室温储存。

三、产品选择指南

微量 DNA 纯化&回收系列试剂盒预期回收率, **2**为 DK402 预期回收率



1 DK412 小片段 DNA 微量纯化试剂盒

特别适合从各种 DNA 反应液中回收小分子 DNA, 不能去除引物二聚体

2 DK402 琼脂糖凝胶 DNA 微量回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA, 有效回收范围 50 bp-15 kb

3 DK404 微量 DNA 快速回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA, 有效回收范围 100 bp-15 kb
从各种 DNA 反应液中回收 DNA, 有效去除引物二聚体

3 DK491 96 微量 DNA 快速回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA, 有效回收范围 100 bp-15 kb

4 DK413 DNA产物微量纯化试剂盒

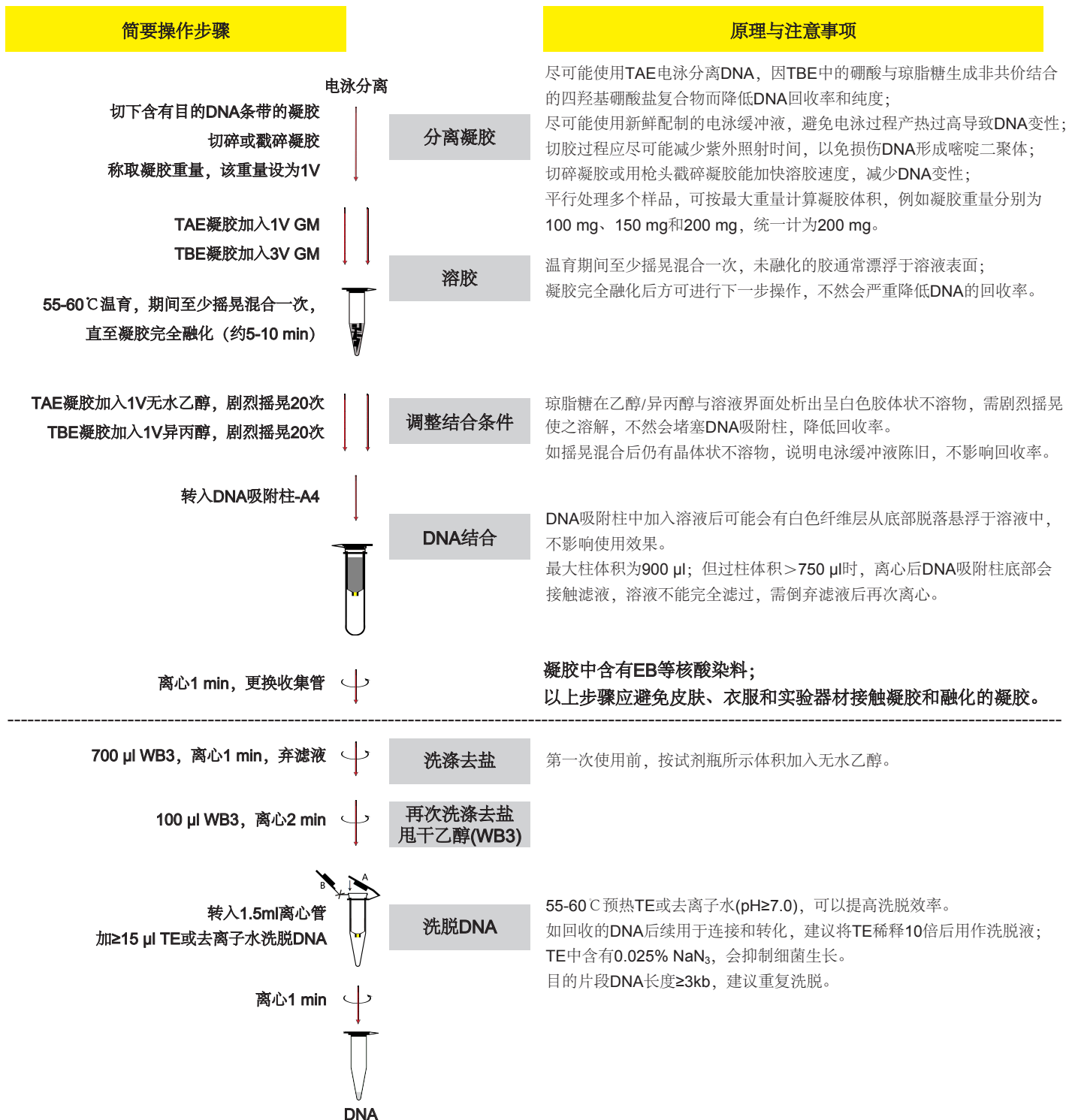
4 DK494 96 DNA产物微量纯化试剂盒

从各种DNA反应液中回收DNA, 有效去除引物二聚体

四、注意事项

1. Buffer GM 含刺激性化合物，避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，应立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处，必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖，以免影响下次使用效果，尤其是添加乙醇后的 Buffer WB3。
3. 建议使用 TAE 电泳分离 DNA，因 TBE 中的硼酸与琼脂糖生成非共价结合的四羟基硼酸盐复合物而降低 DNA 回收率和纯度。
4. 凝胶中含有 EB 等核酸染料，操作步骤 1-4 应避免皮肤、衣服和实验器材接触凝胶和融化的凝胶；操作步骤 4 离心结束后更换收集管能降低沾染核酸染料的风险。
5. 如回收的 DNA 后续用于连接和转化，建议将 TE 稀释 10 倍后用作洗脱液。TE 中含有 0.025% NaN_3 ，会抑制细菌生长。

五、操作流程示意图



六、实验准备

1. 55-60°C水浴或温箱。55-60°C预热 TE 或者去离子水(pH \geq 7.0)。
2. 储存温度低于 10°C时, Buffer GM 可能会析出不溶物, 需 37-56°C加热溶解; 不能使用更高温度加热, 不然试剂瓶会变形。
3. 从 TAE 凝胶中回收 DNA, 需准备无水乙醇; 从 TBE 凝胶中回收 DNA, 需准备异丙醇。
4. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB3 中加入无水乙醇, 混合均匀。

七、操作步骤

所有离心时间按使用台式快速离心机设定, 通常 10 秒内可达最高转速/离心力; 如使用慢升速离心机, 离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温, 12,000-16,000 \times g; 如离心机只能设定转速, 设定为低于最高转速 1,000 rpm。

DNA 吸附柱-A4 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中, 不影响使用效果。

1. 切下含目的 DNA 的凝胶, 称取凝胶重量, 该重量作为一个凝胶体积。例如: 100 mg = 100 μ l 体积。

为了方便平行处理多个样品, 可按最大重量计算凝胶体积, 例如凝胶重量分别为 100 mg、150 mg 和 200 mg, 统一计为 200 mg。

2. 溶胶与调整结合条件, 请根据凝胶种类选择方法 A 或 B:

A. TAE 凝胶

A2.1 加入 1 个凝胶体积的 Buffer GM, 放入 55-60°C水浴或温箱, 温育期间至少摇晃混合一次, 直至凝胶完全融化 (约 5-10 min)。

A2.2 加入 1 个凝胶体积的无水乙醇, 剧烈摇晃 20 次, 混合均匀。继续操作步骤 3;

- ▲ 加入乙醇后, 乙醇与融化的凝胶界面会析出白色不溶物, 需剧烈摇晃至白色不溶物消失, 不然会明显降低回收率。
- ▲ 如摇晃混合后仍有晶体状不溶物, 说明电泳缓冲液已反复使用多次, 不影响回收率, 但电泳过程可能产热过高导致 DNA 变性。

B. TBE 凝胶

B2.1 加入 3 个凝胶体积的 Buffer GM, 放入 55-60°C水浴或温箱, 温育期间至少摇晃混合一次, 直至凝胶完全融化 (约 5-10 min)。

B2.2 加入 1 个凝胶体积的异丙醇, 剧烈摇晃 20 次, 混合均匀。继续操作步骤 3;

- ▲ 加入异丙醇后, 异丙醇与融化的凝胶界面会析出白色不溶物, 需剧烈摇晃至白色不溶物消失, 不然会明显降低回收率。
- ▲ 如摇晃混合后仍有晶体状不溶物, 说明电泳缓冲液已反复使用多次, 不影响回收率, 但电泳过程可能产热过高导致 DNA 变性。

3. 将溶液转入 DNA 吸附柱-A4(置于收集管), 离心 1 min, 丢弃收集管。将 DNA 吸附柱-A4 放入另一个干净的收集管中。

DNA 吸附柱-A4 最大柱体积为 900 μ l, 如溶液体积 $>$ 900 μ l 应分次过柱;

如过柱体积 $>$ 750 μ l, 离心后 DNA 吸附柱-A4 底部会接触滤液, 溶液不能完全滤过, 需倒弃滤液后再次离心。

4. 加入 700 μ l Buffer WB3, 离心 1 min, 弃滤液, 将 DNA 吸附柱-A4 放回收集管中。

5. 加入 100 μ l Buffer WB3, 离心 2 min。

6. 将 DNA 吸附柱-A4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 \geq 15 μ l TE 或去离子水(pH \geq 7.0), 离心 1 min。

- ▲ 55-60°C 预热 TE 或去离子水(pH \geq 7.0), 可以提高洗脱效率。
- ▲ 如使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 \geq 7.0。
- ▲ 目的片段 DNA 长度 \geq 3kb, 建议重复洗脱, 以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法:
 - a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱, 获得的 DNA 浓度高于方法 b;
 - b. 重新加入洗脱液进行洗脱, 洗脱效率高于方法 a。

八、从 DNA 溶液中回收、浓缩 DNA

DNA 溶液体积计为 1 V, 加入 1V Buffer GM 和 1V 无水乙醇, 混合均匀; 继续七、操作步骤 3;

为了方便平行处理多个样品, 可按最大体积计算样品体积, 比如样品体积分别为 50 μ l、75 μ l 和 100 μ l, 统一计为 100 μ l, 每个样品中加入 100 μ l Buffer GM 和 100 μ l 无水乙醇。

九、常见问题解答

Q1 A260/230 比值不正常

- A1.1 未准确调零，A260/230 比值为负值或极高或极低。需要用与洗脱 DNA 一致的缓冲液调零，即用什麼洗脱就用什麼调零。
- A1.2 DNA 浓度低于 20 ng/μl，仪器偏差可能会出现 260/230 比值不正常。
- A1.3 盐残留。琼脂糖凝胶未完全融化，可能会导致盐残留。
- A1.4 琼脂糖残留。琼脂糖质量差或使用 TBE 凝胶分离 DNA，可能会出现琼脂糖残留，此时 255nm 和 260nm 出现双吸收峰，A260/230 比值小于 2.0。琼脂糖残留不影响后续 PCR、酶切和连接等反应。

Q2 回收率很低或回收不到 DNA

- A2.1 漂洗液 Buffer WB3 中未加乙醇，或某次使用后未盖紧试剂瓶盖导致乙醇挥发。
- A2.2 琼脂糖凝胶未完全融化，堵塞 DNA 吸附柱，导致 DNA 不能被有效吸附和洗脱。
- A2.3 操作步骤 2，加入乙醇或异丙醇后未剧烈摇晃，析出的白色不溶物，堵塞 DNA 吸附柱，导致 DNA 不能被有效吸附和洗脱。
- A2.4 起始 DNA 量极少。一般微量分光光度计检测 DNA 浓度下限为 20 ng/μl；琼脂糖凝胶电泳，EB 显色 dsDNA 下限为 10 ng。
- A2.5 溶胶时 DNA 变性(见 A5.1)。单链 DNA 不能与 EB 等核酸染料有效结合；此情况下分光光度计能检测到 DNA，但电泳检测不到 DNA。

Q3 后续 DNA 连接或酶切效率低

- A3.1 步骤5离心时间不足2 min，未彻底去除Buffer WB3(含乙醇，乙醇会抑制连接和酶切等酶反应)。
- A3.2 溶胶时DNA变性(见A5.1)。

Q4 能否用本试剂盒纯化回收>15 kb 的 DNA?

A7 长度>15 kb 的线性 DNA，能与硅胶材料多点结合，后续的离心过程中因机械力而发生断裂。建议使用酚/氯仿抽提后异丙醇沉淀回收。

Q5 回收的 DNA 鉴定目的条带弥散或多出现一个条带

- A5.1 DNA 变性，额外多出比目的片段“小”的条带。电泳缓冲液反复使用多次，电泳过程产热过高导致 DNA 变性；溶胶过程凝胶未完全浸没于 Buffer GM 导致 DNA 变性。
- A5.2 使用 TBE 凝胶电泳分离 DNA，残留的硼酸与琼脂糖复合物降低部分 DNA 迁移率，额外多出比目的片段“大”的条带。

十、回收率与估算方法：

样品回收前应少量留样(以下简称**回收前**)，与回收后的 DNA 按比例平行电泳，估算回收率。

比如，PCR 产物起始体积为 40 μl，最终用 30 μl TE 洗脱(以下简称**回收后**)，建议平行电泳体积为：

回收后 2 μl，**回收前** $100\% \times 40 \times 2 / 30 = 2.7 \mu\text{l}$ (相当于 100%回收率)，**回收前** $75\% \times 40 \times 2 / 30 = 2 \mu\text{l}$ (相当于 75%回收率)

两种典型的回收产物分析

PCR 产物：含有 dNTP、引物、非特异性扩增产物包括引物二聚体、降解的模板 DNA 在 260nm 都有吸收峰；

因此 PCR 产物直接测浓度没有任何意义，也不能作为计算回收率的标准。

质粒酶切产物：以下因素会影响酶切后目的条带的含量：

- 1、基因组 DNA 和 RNA 残留，尤其是 RNA 需短时间电泳才能明显观察到，而且 RNA 降解后 A260 升高(增色效应)；
- 2、质粒的构型：变性为单链的质粒不能被切开，已断裂为线性的质粒酶切后呈涂抹带。
- 3、酶切不完全或内切酶星号活性，使目的产物的量减少。

因此，质粒酶切产物的回收也要电泳验证，应以酶切产物作为标准进行电泳。