

## DNA 凝胶回收试剂盒

本试剂盒是从琼脂糖凝胶中回收纯化 DNA 片段的试剂盒。试剂盒采用了独特的凝胶融解缓冲液，具有较强的缓冲性能并含有 pH 指示剂，方便判断溶液的 pH 值是否适合 DNA 与制备膜结合。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，全部操作只需 20 分钟便可完成。使用本试剂盒每次可纯化得到多至 8 $\mu$ g 以上的 DNA 片段（75bp-10kbp），回收率高。经本试剂盒纯化的 DNA 片段纯度高，完整性好，可直接用于连接反应、PCR 扩增、DNA 测序等各种分子生物学实验。

Cat.	EK02304	EK02305	EK02325
制备次数	4 tests	50 tests	250 tests
DNA mini column	4	50	250
2ml collection tube	4	50	250
1.5ml collection tube	4	50	250
Binding buffer A	6ml	33ml $\times$ 2	165ml $\times$ 2
Binding buffer B	3ml	33ml	165ml
Wash buffer A	2.8ml	28ml	135ml
Wash buffer B	2.4ml	24ml	72ml $\times$ 2
Eluent solution	1ml	5ml	25ml

### 实验前准备：

1. 第一次使用前，Wash buffer B 中加入指定体积的无水乙醇。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 使用前检查 Binding buffer B 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 70 $^{\circ}$ C 水浴加热熔化并冷却至室温后使用。

### 操作步骤：

1. 称取一个 1.5ml 离心管的重量，并记录。
2. 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶条带，用纸巾吸尽凝胶表面液体放入离心管并切碎。称取离心管和凝胶总重量后，计算得到凝胶重量，以该重量作为一个凝胶体积（如 100 mg=100 $\mu$ l 体积）。
3. 加入 3 倍凝胶体积的 Binding buffer A，混合后 75 $^{\circ}$ C 加热（低熔点琼脂糖凝胶可 40 $^{\circ}$ C 加热），每 2-3 分钟间断混合一次，直至凝胶块完全熔化（约 6-8 分钟）。

注：Binding buffer A 为红色溶液。在熔化凝胶的过程中，可以帮助观察凝胶是否完全熔化。

4. 加 1.5 倍凝胶体积的 Binding buffer B，充分混匀。当分离的 DNA 片段小于 400bp 时，需再加入 1 倍凝胶体积的异丙醇。

注：加入 Binding buffer B 后混合物颜色变为黄色，充分混合以保证形成均一的黄色溶液。

下面操作可以选择离心法或负压法。

**A. 离心法**

- 5A. 吸取步骤 4 中的混合液，转移到 DNA mini column（置于 2 ml collection tube。试剂盒内提供）中，12,000×g 离心 1 min，弃滤液。
- 6A. 将 DNA mini column 置回 2 ml collection tube，加入 500 μl Wash buffer A，12,000g 离心 30 秒，弃滤液。
- 7A. 将 DNA mini column 置回 2 ml collection tube，加入 700 μl Wash buffer B，12,000g 离心 30 秒，弃滤液。以同样的方法再用 700 μl Wash buffer B 洗涤一次 12,000×g 离心 1 min。
- 8A. 将 DNA mini column 置回 2 ml collection tube 中，12,000×g 离心 1 min。弃滤液。

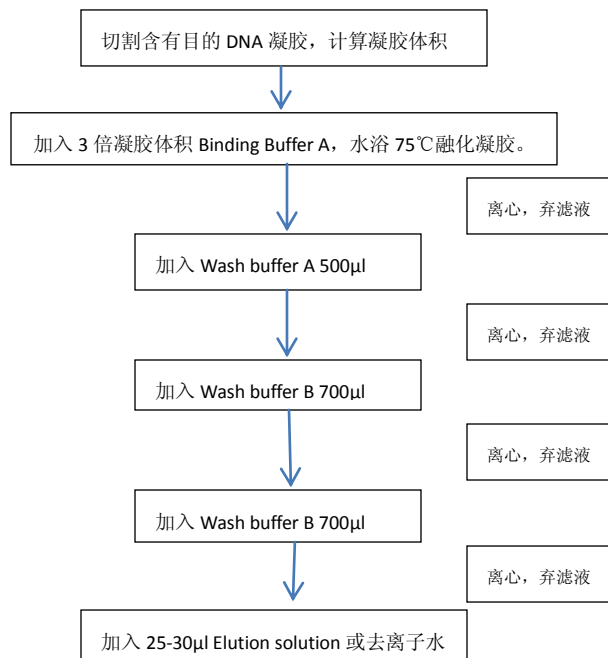
**B. 负压法**

- 5A. 正确连接负压装置，将 DNA mini column 插到负压装置的插口上。吸取步骤 4 中的混合液，转移到 DNA mini column 中，开启并调节负压至-85~100kPa，缓慢吸走管中溶液。
- 6B. 加入 500 μl Wash buffer A，负压吸尽管中溶液。
- 7B. 加入 700 μl Wash buffer B，负压吸尽管中溶液。再次加入 700 μl Wash buffer B，负压吸尽管中溶液。
- 8B. 将 DNA mini column 放置于 2 ml collection tube（试剂盒内提供）中，12,000×g 离心 1 min。弃滤液。

- 9. 将 DNA mini column 置于 1.5 ml collection tube（试剂盒内提供）中，在 column 膜上均匀加入 25-30 μl Eluent solution 或去离子水，室温静置 1 min，12,000×g 离心 1min 洗脱 DNA。

注：将 Eluent solution 或去离子水加热至 65℃可提高洗脱效率。

离心法流程图：



## 保存:

本试剂盒于室温下保存和运输。

## 注意事项:

1. Binding buffer A、Binding buffer B 和 Wash buffer A 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，应立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。
2. 在步骤 1 中，将凝胶切成细小的碎块可大大缩短凝胶熔化时间（线性 DNA 长时间暴露在高温条件下易于水解），从而提高回收率。勿将含 DNA 的凝胶长时间地暴露在紫外灯下，减少紫外线对 DNA 造成的损伤。

## 常见问题:

主要问题	原因	建议
回收率低	1、洗脱效率低	最后一次 Wash buffer B 洗涤后不要将制备管放于负压装上抽得过干。 洗脱液或者去离子水 65℃ 预热以及增加洗脱前静置时间至 5min，有助于提高洗脱效率。 选用合适浓度的琼脂糖凝胶电泳，上样量不超过制备管的最大结合量（8 μg）。
	2、DNA 片段被过早的洗脱	Wash buffer B 中未加入无水乙醇 确保加入正确的乙醇量。每次使用后应拧紧瓶盖，以免乙醇挥发，降低回收率。
	3、目的片段结合率低	琼脂糖凝胶未完全熔化，导致凝胶在后续洗涤过程出现硅胶膜堵塞，最终影响回收率。 小于 400bp 的片段未加异丙醇 电泳缓冲液 pH 值过高，影响目的片段的结合 在切胶时尽可能去除不含目的片段 DNA 的琼脂糖，确保 Binding buffer A 的正确用量。在熔胶过程中要仔细检查确保无固体琼脂糖残留，间断性的对样品进行混匀，以保证充分熔化。 务必确保加入 1 倍凝胶体的异丙醇。 建议加入 10 μl 3M NaAC 中和。
后续酶促反应不理想	1.盐污染	确保用 Wash buffer B 洗涤 2 次。
	2.乙醇污染	在最后一次 Wash buffer B 洗涤后可将制备管离心时间由原来 1min 增加到 2min。
	3、洗脱产物中含有 ssDNA	将洗脱产物 95℃ 加热 2min，并冷却至室温，使单链 DNA 重新退火即可。