

DNA胶回收试剂盒

说明书修订日期: 2022.08.15

Cat Number: KGA3050/KGA30100

Store at RT/ 4°C for 3 years

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒说明

凯基DNA胶回收试剂盒适用于从 TAE 和 TBE 琼脂糖凝胶中回收 100 bp~10 kb 的 DNA 片段, 回收效率在 80% 以上。该试剂盒采用特殊的吸附膜和结合缓冲液 (Buffer B2), 能够有选择性地吸附核酸分子, 去除体系中的蛋白、小分子、盐分等其他杂质, 通过洗脱液 (Elution Buffer) 将 DNA 从吸附柱中释放, 得到高质量的 DNA 回收产物。本试剂盒采用的膜结合液中含有干扰酶活性的碘化钠, 所得到的 DNA 可直接用于酶切、连接、测序等后续分子生物学实验。

产品特点

与经典的凝胶回收、纯化方法相比较, 本试剂盒具有以下特点:

- 快速——在15min内就可以从凝胶中回收 DNA;
- 可靠——最适的缓冲液保证了高纯度的 DNA;
- 安全——这是无有机物的抽提;
- 质量——纯化得的 DNA 可做任何下游应用。

二、试剂盒组份

组份	KGA3050 50T	KGA30100 100T	储存
离心吸附柱+收集管	50套	100套	RT
溶胶液	50ml	100 ml	RT
漂洗液	12ml	24ml	RT
洗脱液	5ml	10ml	RT

三、操作步骤 (所有离心步骤都在室温下进行)

1. 在琼脂糖凝胶-EB 电泳后, 在紫外灯上小心的把所需的 DNA 片段切下来, 尽量去除多余的凝胶并尽量少带电泳缓冲液, 称重, 装入 1.5ml 离心管, 用 Tip 头捣碎。(每管凝胶块不要超过400mg, 以免溶胶不完全)
2. 加入 3 -6倍凝胶重量的溶胶液于 50°C 保温5-10min, 或直至凝胶完全融化。期间可振荡促融。等凝胶完全融化后要立刻加入异丙醇。
3. (选做) 目的片段<500bp时, 加入溶胶液体积1/3的异丙醇, 混匀。若目的片段≥500bp,此步骤可省略。
4. 将上述溶胶混合液移入离心吸附柱, 室温 8000g 离心 30s, 倒掉过柱液将吸附柱放入同一个收集管中。
5. 向吸附柱中加入300ul溶胶液, 9000g离心30s, 倒掉过柱液将吸附柱放入同一个收集管中。
6. 向吸附柱中加入500ul漂洗液, 9000g离心30s, 倒掉过柱液将吸附柱放入同一个收集管中。
7. 重复步骤6。
8. 将空吸附柱和收集管放入离心机, 9000g离心1min。
9. 在吸附膜中央加入15-40ul 洗脱液, 室温静置1-2min, 9000g离心1min, 将所得到的DNA溶液置于-20 保存或用于后续实验。

DNA 的产量与质量:

把抽提到的样品稀释一定的倍数后, 分别测量其在 260nm 和 280nm 下处的吸光值。回收得到的 DNA 浓度可按下列

公式算出:

$$[\text{DNA 浓度}] = A_{260} \times 50 \times (\text{稀释倍数}) \mu\text{g/ml}$$

长度大于 500bp 的片段通常能纯化得到 80% 的产量。而 50bp—500bp 的带则可达到 50%—80% 的回收率。用 A_{260} 与 A_{280} 的比值可显示核酸的纯度, 若其比值大于 1.8, 表示核酸浓度大于 90%。另外, DNA 的回收产量 (或者是产物的质量) 有时也主要取决于琼脂糖—EB 电泳的情况。

四、注意事项

1. 洗脱液为 2.5mM Tris-HCL (pH=8.5), 但不含 EDTA; 洗脱的 DNA 应冷冻储存, 以防 DNA 降解。
2. 如果使用 TE(pH8.0) 洗脱效率更高, 但其中的 EDTA 可能会干扰后续酶促反应。
3. DNA 在高盐环境可以吸附在玻璃和硅质材料上。在含有大量阴离子的高电解质环境下孵育 DNA, 会引起其在水中结构的改变, 迫使其吸附在硅质材料上。DNA 吸附到硅基质上还取决于 pH 值。通常当 $\text{pH} \leq 7.5$ 时吸附效率为 95%, $\text{pH} > 7.5$ 后效率急剧下降。
4. 溶胶液中含刺激性化合物, 操作过程中应穿上实验服, 防止沾染皮肤、眼睛和衣物, 防止吸入口鼻, 如沾染皮肤或眼睛, 请立即用清水或生理盐水冲洗。

五、常见问题分析以及解决方案

可能问题	可能原因	建议解决方法
低 DNA 产量	加入太少量的溶胶液	错误判断割下的琼脂糖凝胶的体积, 按照使用说明加入足够量的溶胶液。
	琼脂糖凝胶不能完全溶解于溶胶液	确保水浴温度在 50°C 以令凝胶完全溶解。
	TAE 电泳缓冲液不新鲜	用过的缓冲液可能已失去了其缓冲能力而 pH 值上升, 这样就会升高琼脂糖-DNA-溶胶液的 pH, 从而影响 DNA 结合到离心吸附柱基质上。使用新鲜配制的缓冲液, 这样不仅可以增加产量, 也可防止提取到的 DNA 被污染。
柱子堵塞	琼脂糖凝胶没有完全溶解在溶胶液	确保水浴温度在 50°C 以上完全溶解凝胶。对于大块的凝胶薄片 (>0.3ml), 我们建议把胶切成更碎的小块以帮助溶解。
无 DNA	漂洗液没有用无水乙醇稀释	按照使用说明来准备好漂洗液。
	加入的溶胶液体积不适合	对于 <200bp 的 DNA 片断, 加入 6 倍体积的溶胶液
OD 值与琼脂糖凝胶中的 DNA 产量不相符	从柱子上洗脱下来的痕量杂质增加了 A_{260} 的值	确保是按照步骤 5 和 6 的方法来洗涤柱子。另一方面, 还取决于琼脂糖/EB 电泳的量。
点样时样品漂出孔外	在洗涤完之后没有把柱上的乙醇完全除去	按步骤 7 的说明离心柱子以甩干之, 然后再进行下面的洗脱步骤。