

# 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒

说明书修订日期：2015.07.13

Cat Number: KGA3050/KGA30100

Store at RT/ 4°C for 24 months

For Research Use Only (科研专用)

## 一、试剂盒说明

凯基琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒采用机械切割的硅胶膜吸附材料作为离心吸附柱，在优化的指定缓冲液提供的条件下，可选择性结合回收目标 DNA，去除污染杂质；溶胶液的溶胶效率高，并含特有成分消除硼酸对吸附的干扰，适用于 TAE 和 TBE 缓冲液；回收 40bp-50kb 片段效果佳。回收的产物可用于 PCR、酶切、连接反应、测序等工作。

### 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≤120min 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	50 个	100 个	RT
溶胶液	25ml	50 ml	RT
漂洗液	50ml	100ml	RT
洗脱液	5ml	10ml	RT
pH 调节剂	0.6ml	1.2 ml	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。
2. 按照凝胶的重量可近似地确定其体积。假设其密度为 1g / ml，于是凝胶的体积便可通过如下方法得到：凝胶薄片的重量为 0.2g 则其体积为 0.2ml。
3. 加入 3 倍凝胶体积的溶胶液于 50℃ 保温 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。

DNA 片段不同加入异丙醇的量也不同，见下表：

A. 当 DNA 片段小于 500 bp 时	使用 3 倍体积溶胶液，溶胶后加入 1 倍凝胶体积的异丙醇。
B. 当 DNA 片段小于 200 bp 时	使用 5 倍体积溶胶液，溶胶后添加 1 倍凝胶体积的异丙醇。
C. 若 DNA 片段大于 4 kb 时	使用 3 倍体积溶胶液，溶胶后加入 1 倍凝胶体积的异丙醇。
D. 当凝胶浓度大于 2% 时	使用 5 倍体积溶胶液。

### 注意：

如带入过多电泳缓冲液，溶胶混合液会变为浅红色或淡紫色，表明 pH >7.5，DNA 回收率将显著降低。可加入 5-10μl pH 调节剂，颜色恢复到透明黄色即可。

4. 将上述溶胶混合液移入离心吸附柱，室温 12000 rpm 离心 1min，倒掉过柱液。依此处理剩余的溶胶混合液。
5. **选做步骤：**用 300μl 溶胶液来洗涤柱子，并在 10000 rpm 下离心 1min。
6. 加入 700-800μl 漂洗液，12000 rpm 离心 1min，倒掉收集管内液体。

(注意: 如果用于对盐离子敏感的后续实验, 加入漂洗液后静置 2-5min, 然后离心)

7. 将离心吸附柱放入新的 1.5 ml 离心管, 室温 13000 rpm 离心 1min, 甩干柱子基质
8. 将离心吸附柱转入 1.5 ml 干净离心管, 加 30-100 $\mu$ l 洗脱液(洗脱液如加热到 50 $^{\circ}$ C 效果更佳), 静置 1min, 13000 rpm 离心 1min, 过柱液为所提的 DNA 溶液, -20 $^{\circ}$ C 储存。

#### 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 10mM Tris(pH8.0-8.5), 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. 如果认为洗脱液(10mM Tris, pH8.0-8.5) 不适合后面的实验应用, 可以使用 pH>7.5 的纯水。要注意一般由纯水机制备的纯水偏酸性, 应调节至 pH>7.5, 否则洗脱效率将大大降低。
4. 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 吸附到硅质上还取决于 pH 值。通常当 pH $\leq$ 7.5 时吸附效率为 95%, pH>7.5 后效率急剧下降。
5. 溶胶液溶解琼脂糖凝胶, 同时为 DNA 吸附到离心吸附柱上提供了离子环境。溶胶液中已经加入了 pH 值指示剂, 以便于判断 DNA 吸附环境的 pH 值是否合适。DNA 在 pH $\leq$ 7.5 时吸附, 此时溶胶体系为黄色。电泳缓冲液多次重复使用或者不正确配制的情况下, 溶解胶时溶液为橙红色或紫色, 这表示样品的 pH 值超出了溶胶液的缓冲能力, DNA 将不能有效吸附, 可以加入少量 pH 调节剂(pH5.0 的 3M 醋酸钠) 调节。

## 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。