

ATGPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit

DNA 胶回收试剂盒 (柱式法)

D102



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品特点	1
产品组成	1
储存条件	1
注意事项	1
实验方案	2
常见问题	4

产品简介

本试剂盒适用于从 TAE 和 TBE 琼脂糖凝胶中回收 100 bp ~ 10 kb 的 DNA 片段，回收效率可达 80%。该试剂盒采用特殊的吸附膜，能够有选择性的吸附核酸分子，去除其他杂质，得到高质量的 DNA 回收产物。本试剂盒采用的膜结合液中不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

适用范围广，回收效率高。

操作简单快速，整个回收过程仅需 15 min 左右。

洗脱效率高，洗脱体积最小可低至 15 μ l。

产品组成

组分	D102-100 (100 rxns)
纯化套件 (吸附柱+收集管)	100 套
Buffer B2	100 ml
Wash Solution	24 ml
Elution Buffer	10 ml

储存条件

本试剂盒在室温 (15 ~ 25°C) 干燥保存，有效期见包装。

注意事项

Buffer B2 中含有刺激性的化合物，操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

实验方案

自备材料：水浴锅、小型高速离心机 (最大离心力 $\geq 12,000 \times g$)、1.5 ml 离心管、无水乙醇、异丙醇等。

按瓶身标签说明在 Wash Solution 中加入相应量的无水乙醇 (乙醇终浓度为 80%) ,混匀后在瓶身做好标记。于室温密封保存。

每次使用前请检查 Buffer B2 是否出现沉淀, 如有沉淀, 请于 37°C 溶解沉淀, 待冷却至室温后使用。提前将水浴调至 55°C 备用。

1. 通过琼脂糖凝胶电泳尽可能将目的 DNA 片段与其他片段分开, 用干净的手术刀片将含目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶块切下, 放入 1.5 ml 离心管中, 称重。

- ❖ 尽可能多地去掉不含目标 DNA 的琼脂糖。
- ❖ 每管琼脂糖凝胶块不要超过 400 mg, 否则导致溶胶不完全。
- ❖ 切胶过程尽可能快, 减少 DNA 在紫外线中的暴露时间以降低对 DNA 的损伤。

2. 根据胶块的重量和浓度, 按每 100 mg 琼脂糖 (如胶块不足 100 mg 则用水补充至 100 mg) 加 300 ~ 600 μl 的比例加入 Buffer B2。

- ❖ 凝胶浓度 $\leq 1\%$, 每 100 mg 凝胶加入 300 μl Buffer B2;
- ❖ $<1\%$ 凝胶浓度 $\leq 1.5\%$, 每 100 mg 凝胶加入 400 μl Buffer B2;
- ❖ $<1.5\%$ 凝胶浓度 $\leq 2\%$, 每 100 mg 凝胶加入 500 μl Buffer B2;
- ❖ 凝胶浓度 $>2\%$, 每 100 mg 凝胶加入 600 μl Buffer B2。

3. 将离心管置于 55°C 水浴 5 ~ 10 min, 间或混匀, 直至胶块完全溶化。

- ❖ 胶块完全溶化即可, 过长时间的处理可能导致 DNA 损伤。

4. (可选步骤) 当目的片段 $< 500\text{bp}$ 时, 加入所使用的 Buffer B2 体积 1/3 的异丙醇, 混匀。当目的片段 $\geq 500\text{bp}$ 时, 此步骤可以省略, 直接进行步骤 5。

5. 将溶化好的溶液全部移入吸附柱, $8,000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

- ❖ 如果溶胶液总体积大于 750 μl , 则每次使用 750 μl , 多次上柱。

6. 向吸附柱中加入 300 μl Buffer B2, $8,000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

7. 向吸附柱中加入 500 μl Wash Solution, $9,000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

- ❖ Wash Solution 首次使用前请检查是否已加入正确量的无水乙醇。

8. 重复步骤 7 一次。

9. 将空吸附柱和收集管放入离心机， $9,000 \times g$ 离心 1 min，将吸附柱置于新的 1.5 ml 离心管中。
 - ❖ 此步绝不可省略，否则残余的乙醇会严重影响得率和后续实验。
 - ❖ 离心后可将吸附柱与 1.5 ml 离心管整个装置开盖置于 50°C 烘箱、超净台或通风橱中吹风 5 ~ 10 min，以彻底去除残留的乙醇。

10. 在吸附膜中央加入 15 ~ 40 μl Elution Buffer，室温静置 1 ~ 2 min， $9,000 \times g$ 离心 1 min。将所得到的 DNA 溶液置于 -20°C 保存或用于后续试验。
 - ❖ Elution Buffer 为 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5，可以用 TE 或水 (pH>7.0) 代替。
 - ❖ 将 Elution Buffer 预热至 60°C 可以进一步提高得率。
 - ❖ 如果质粒 > 4 kb，在 $37 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 min 可以显著提高得率。
 - ❖ 请勿使用小于 15 μl 的洗脱液进行洗脱。

常见问题

1. DNA 回收效率较低或者未回收到目的片段

- A. 胶块溶解不完全：可适当延长水浴的时间，并增加颠倒混匀的频率辅助溶解。
- B. 胶块体积太大：溶胶困难。可先将胶块切碎，溶胶后分多次上柱离心，回收 DNA 片段。
- C. 漂洗液中未加入正确量的无水乙醇。
- D. Agarose 抑制 DNA 与吸附材料的结合：应尽量切除不含目的 DNA 片段的 Agarose 胶。
- E. 提高 Buffer B2 的相对浓度，增加 DNA 与吸附膜的作用时间（静置时间），在一定程度上可以提高回收率。
- F. 如果纯化的片段长度大于 4 kb 或者目的片段含量较少，可以将洗脱液再次加入至吸附柱中进行洗脱，以提高回收效率。
- G. 洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜的中心部位，以完全覆盖硅胶膜的表面，达到最大的洗脱效率。
- H. 洗脱液不合适：洗脱缓冲液的 pH 值对洗脱效率有影响，如果使用水进行洗脱，请确保其 pH 值 > 7.0，pH 值过低可能导致低洗脱效率。
- I. 洗脱时间过短：洗脱时放置 1 min 可达到较好的洗脱效果。洗脱时将洗脱液预热至 60°C 后使用，有利于提高洗脱效率。

2. 回收 DNA 进行后续酶切反应效率低

- A. 洗脱产物中含有残留的乙醇：可将离心后的吸附柱开盖室温干燥 2 ~ 5 min，有助于残留的乙醇挥发完全。
- B. 盐分的残留：请确保使用 Wash Solution 洗涤两次，每次 500 μ l 沿管壁加入，有助于彻底去除管壁上的盐份。
- C. 回收后的 PCR 产物在反复冻溶的情况下，会加速末端 A 和整个 PCR 产物的断裂，从而造成与 T 载体连接或直接酶切效率的下降。建议回收后立即进行酶切或连接实验。选择合适的 PCR 产物和 T 载体的分子数比例，有助于提高连接效率。

3. 琼脂糖凝胶胶块不溶

- A. 含目的片段的胶块在空气中放置时间过长，使胶块失水、干燥。建议切胶后立即进行胶回收，或将胶块保存在 4°C 或 -20°C 备用。
- B. 配置琼脂糖凝胶的电泳缓冲液浓度过高或陈旧。应重新配置缓冲液。

4. 洗脱液的选择

- A. 洗脱液可以根据后续实验的需要来确定：一般情况下，若需要进行测序反应，请用双蒸水洗脱。如果需要长期保存 DNA，请用 TE 洗脱。



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室