

## UE DNA 凝胶回收试剂盒

本试剂盒适合从各种琼脂糖凝胶中回收多至 8 μg DNA (70 bp-10 Kb)，回收率为 60-85%。琼脂糖凝胶在温和的缓冲液 (DE-A 溶液) 中融化，其中的保护剂能防止线状 DNA 在高温下降解，然后在 DE-B 溶液的作用下使 DNA 选择性结合到膜上。纯化的 DNA 纯度高，并保持片段完整性和高生物活性，可直接用于连接、体外转录、PCR 扩增、测序、微注射等分子生物学实验。

### 一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-GX-10	UE-GX-50	UE-GX-250	UE-GX-500
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps	500 preps
Miniprep column	10	50	250	500
2 ml microfuge tube	10	50	250	500
1.5 ml microfuge tube	10	50	250	----
Buffer DE-A	14 ml	2×33 ml	2×165 ml	2×330 ml
Buffer DE-B	7 ml	33 ml	165 ml	330 ml
Buffer W1	6 ml	28 ml	145 ml	280 ml
Buffer W2 concentrate	5 ml	24 ml	2×72 ml	2×120 ml
Eluent	1 ml	5 ml	25 ml	50 ml
Protocol manual	1	1	1	1

Buffer DE-A: 凝胶熔剂，含 DNA 保护剂，防止 DNA 在高温下降解。室温密封贮存。

Buffer DE-B: 结合液 (促使大于 70 bp 的 DNA 片段选择性结合到 DNA 制备膜上)。室温密封贮存。

Buffer W1: 洗涤液，室温密封贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液，使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇 (用 100%乙醇或 95%乙醇)，混合均匀，室温密封贮存。

Eluent: 洗脱液，室温密封贮存。

### 二、注意事项

1. Buffer DE-A (含有β-巯基乙醇)、Buffer DE-B 和 Buffer W1 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，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，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融化时间(线型 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。
3. 在步骤 2 中凝胶必须完全融化，否则将严重影响 DNA 回收率。
4. 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
5. DNA 分子呈酸性，建议在 2.5 mM Tris-HCl, pH 7.0-8.5 洗脱液中保存。

### 三、实验准备

1. 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 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. 准备 75°C 水浴。
4. 使用前，检查 Buffer DE-B 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 70°C 水浴加热融化并冷却至室温后再使用。

### 四、操作步骤

1. 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量 (提前记录 1.5 ml 离心管重量)，该重量作为一个凝胶体积 (如 100 mg=100 μl 体积)。
2. 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A，混合均匀后于 75°C 加热 (低熔点琼脂糖凝胶于 40°C 加热)，间断混合 (每 2-3 min)，直至凝胶块完全融化 (约 6-8 min)。

\*Buffer DE-A 为红色溶液。在融化凝胶的过程中，可以帮助观察凝胶是否完全融化。

3. 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B，混合均匀。当分离的 DNA 片段小于 400 bp 时，需再加入 1 个凝胶体积的异丙醇。

\*加 Buffer DE-B 后混合物颜色变为黄色，充分混匀以保证形成均一的黄色溶液。

步骤 4-6 可以选择负压法或离心法。

#### A. 负压法

4A. 正确连接负压装置，将 DNA 制备管插到负压装置的插口上。吸取步骤 3 中的混合液，转移到制备管中，开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。

5A. 加 500 μl Buffer W1，吸尽管中溶液。

6A. 加 700 μl Buffer W2，吸尽管中溶液。以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次。

\*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

\*两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对后续实验的影响。

7A. 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒提供) 中，12,000×g 离心 1 min。

#### B. 离心法

4B. 吸取步骤 3 中的混合液，转移到 DNA 制备管 (置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中，12,000×g 离心 1 min。弃滤液。

5B. 将制备管置回 2 ml 离心管，加 500 μl Buffer W1，12,000×g 离心 30 s，弃滤液。

6B. 将制备管置回 2 ml 离心管，加 700 μl Buffer W2，12,000×g 离心 30 s，弃滤液。以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次，12,000×g 离心 1 min。

\*确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

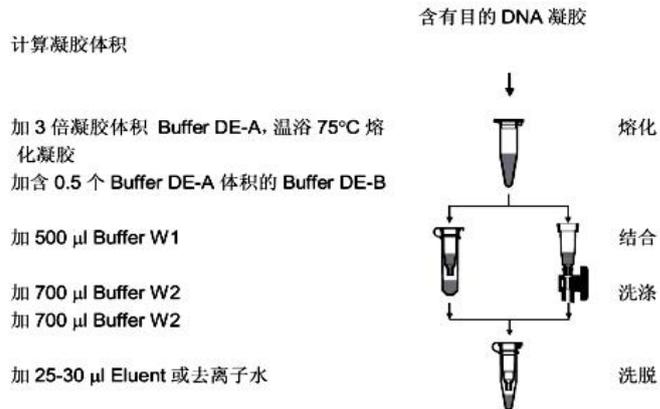
\*两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对后续实验的影响。

7B. 将制备管置回 2 ml 离心管中，12,000×g 离心 1 min。

8. 将制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管中，在制备膜中央加 25-30 μl Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000×g 离心 1 min 洗脱 DNA。

\*将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 将提高洗脱效率。

### 五、流程图



六、常见问题分析

主要问题	现象	建议
回收率低	目的片段结合量低	1) 在切胶时尽可能去除不含目的片段的琼脂糖，确保Buffer DE-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，间隔性的对样品进行摇晃促进凝胶的充分融化 2) 务必确保已加入1倍凝胶体积的异丙醇（100%）。 3) 建议加入10 μl 3M NaAC中和。
	结合的DNA片段过早的被洗脱	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。
	洗脱效率低	1) 最后一次Buffer W2洗涤完后不要将制备管放于负压装置上抽得过干。 2) 洗脱液或者去离子水65°C预热以及增加洗脱前静置时间至5 min，都可提高洗脱效率。 3) 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）。
后续酶促反应不理想	1.盐污染 2.乙醇污染 3.琼脂糖残留 4.洗脱产物中含有ssDNA	1) 确保用Buffer W2洗涤2次。 2) 在最后一次Buffer W2洗涤后可将制备管离心时间由原来1 min增加至2 min。 3) 切胶时尽可能去除不含有DNA片段部分的凝胶以便于对琼脂糖的处理，确保琼脂糖块在Buffer DE-A 中完全融化。 4) 将洗脱产物95°C加热2 min，慢慢冷却至室温，使单链DNA重新退火即可。