

UE 通用型 DNA 纯化回收试剂盒

本试剂盒适合从琼脂糖凝胶中回收 DNA (70 bp-10 kb)，回收量多至 8 µg，回收率为 60~85%，琼脂糖凝胶在温和的缓冲液中熔化，其中保护剂能防止线状 DNA 在高温下降解，然后在结合缓冲液作用下使 DNA 选择性的结合到膜上。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。

同时本试剂盒可以直接用于 PCR 产物、酶促反应、测序反应的反应液中提取 DNA (大于 75 bp)，提取多至 8 µg，回收率为 70~90%，纯化的 DNA 不含引物、酶蛋白及单核苷酸。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	UE-GX/PCR-10	UE-GX/PCR-50	UE-GX/PCR-250
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps
Miniprep column C15	10	50	250
2 ml Microfuge tube	10	50	250
1.5 ml Microfuge tube	10	50	250
Buffer A	6 ml	28 ml	145 ml
Buffer DE-A	12 ml	50 ml	230 ml
Buffer PCR-B	12 ml	50 ml	230 ml
Buffer W2 concentrate	5 ml	24 ml	2×72 ml
Eluent	1 ml	5 ml	25 ml
Protocol manual	1	1	1

Buffer A：制备管活化处理液，室温密闭贮存。

Buffer DE-A：凝胶熔化剂，含 DNA 保护剂，防止 DNA 在高温下降解。室温密闭贮存。

Buffer PCR-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)。室温密闭贮存。

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，室温密闭贮存。

Eluent：洗脱液，室温密闭贮存。

二、注意事项

- Buffer DE-A(含有β-巯基乙醇)、Buffer PCR-B 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。
- 在凝胶回收步骤 2 中，将凝胶切成细小的碎块可大大缩短凝胶熔化时间(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 的凝胶时间地暴露在紫外灯下，减少紫外线对 DNA 造成的损伤。
- 在凝胶回收步骤 3 中，凝胶必须完全熔化，否则将严重影响 DNA 回收率。
- 如果回收率较低，可在胶充分溶解后检测 pH 值，如果 pH 大于 7.5，可向含有 DNA 的胶溶液中加入 3M 醋酸钠调节 pH 至 4-6 之间。
- 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
- 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。
- 回收率低建议：
 - 混合液转移至吸附柱可以放置 2-5 min；
 - 加热洗脱液温度；
 - 洗脱液二次重复洗脱。

三、实验准备

- 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
- 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。

- 准备 75°C 水浴。

四、操作步骤

凝胶回收操作步骤

- 制备管活化处理：向置于 2 ml 离心管中的制备管里添加 500 µl Buffer A，12,000×g 离心 1 min，弃除滤液。
**柱平衡处理过程能够改善吸附柱的均一性和稳定性，减少批间差异，消除高温/潮湿或者环境其它不良因素对吸附柱造成的影响。*
- 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)。
- 加入 2 个凝胶体积的 Buffer DE-A，混合均后于 75°C 加热(低熔点琼脂糖凝胶于 40°C 加热)，其间不断温和的上下混合(每 2-3 min)，直至凝胶块完全熔化(约 6-8 min)。Buffer DE-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。
- 凝胶完全融化后加入与 Buffer DE-A 等体积的 Buffer PCR-B，混合均匀。
**混合物充分混匀以保证形成均一的黄色溶液。*

步骤 5-7 可以选择离心法或者负压法

离心法：

- 吸取步骤 4 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。
- 将制备管置回 2 ml 离心管，加 700 µl Buffer W2，12,000×g 离心 1 min，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。*
- 将制备管置回 2 ml 离心管中，12,000×g 离心 1 min。

负压法

- 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 4 中的混合液，转移到制备管中，开启负压装置，缓慢吸走管中溶液。
- 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。*
- 将制备管置于 2 ml 离心管(试剂盒提供)中，12,000×g 离心 1 min。
- 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。*

清洁试剂盒操作步骤

1. 制备管活化处理：向置于 2 ml 离心管中的制备柱里添加 500 μ l Buffer A, 12,000 $\times$ g 离心 1min, 弃滤液。

*制备管活化处理过程能够改善吸附柱的均一性和稳定性，减少批间差异，消除高温/潮湿或者环境其它不良因素对吸附柱造成的影响。

2. 在 PCR、酶切、酶标或测序反应液中,分别加入 2 倍体积的 Buffer DE-A 和 2 倍体积的 Buffer PCR-B, 混合均匀。

*DNA 片段小于 1kb, 吸附柱放置时间较长可以添加 1/3 体积 PCR-B 的异丙醇以提高片段的回收得率。

步骤 3-5 可以选择离心法或者负压法

A. 离心法：

- 3A. 步骤 2 中的混匀液转移到制备管中，将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 $\times$ g 离心 1 min, 弃滤液。
- 4A. 将制备管置回 2 ml 离心管，加 700 μ l Buffer W2, 12,000 $\times$ g 离心 1 min, 弃滤液；以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
- 5A. 将制备管置回 2 ml 离心管中，12,000 $\times$ 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。

B. 负压法

- 3B. 正确连接负压装置，将制备管插到负压装置的插口上，将步骤 2 中的混匀液转移到制备管中，开启并调节负压至-25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
- 4B. 加 700 μ l Buffer W2, 吸尽管中溶液。以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
- 5B. 将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000 $\times$ g 离心 1 min。
6. 将制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管，在制备管膜中央加 25-30 μ l Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。12,000 $\times$ g 离心 1 min 洗脱 DNA。

*将 Eluent 或去离子水加热至 65 $^{\circ}$ C将提高洗脱效率。

五、流程图

1. DNA 凝胶回收

加 500 μ l Buffer A



活化

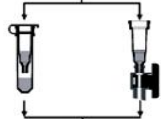
加 2 倍凝胶体积 Buffer DE-A, 温浴 75 $^{\circ}$ C 融化凝胶。加与 Buffer DE-A 等体积的 Buffer PCR-B



结合

加 700 μ l Buffer W2

加 700 μ l Buffer W2



洗涤

加 25-30 μ l Eluent 或去离子



洗脱

2. PCR 清洁

加 500 μ l Buffer A



活化

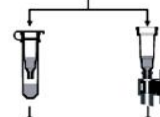
加样品和 2 倍体积的 Buffer DE-A

加与 Buffer DE-A 等体积的 Buffer PCR-B



加 700 μ l Buffer W2

加 700 μ l Buffer W2



结合

洗涤

加 25-30 μ l Eluent 或去离子水



洗脱