

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) 中熔化，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，并保持片断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 C15	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: 凝胶熔化剂，含 DNA 保护剂，防止 DNA 在高温下降解。室温密闭贮存。

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)。室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液，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

1. Buffer DE-A(含有β-巯基乙醇)、Buffer DE-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。
2. 在凝胶回收步骤 1 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. 在凝胶回收步骤 2 中，凝胶必须完全熔化，否则将严重影响 DNA 回收率。
4. 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。
5. 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
6. 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。
7. 回收率低建议：
 - 1) 混合液转移至制备柱可以放置 2-5 min;
 - 2) 加热洗脱液温度;
 - 3) 洗脱液二次重复洗脱。

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 温浴加热熔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。

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。
4. (可选) 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 0.1 M NaOH，12,000×g 离心 1 min，弃除滤液。

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

*建议制备管放置超过 6 个月进行活化处理。

步骤 5-8 可以选择离心法或者负压法

A. 离心法

- 5A. 吸取步骤 3 中的混合液，转移到置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 的制备管中，12,000×g 离心 1 min，弃滤液。
- 6A. 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。
- 7A. 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。
- 8A. 将制备管置回 2 ml 离心管中，12,000×g 离心 1 min。

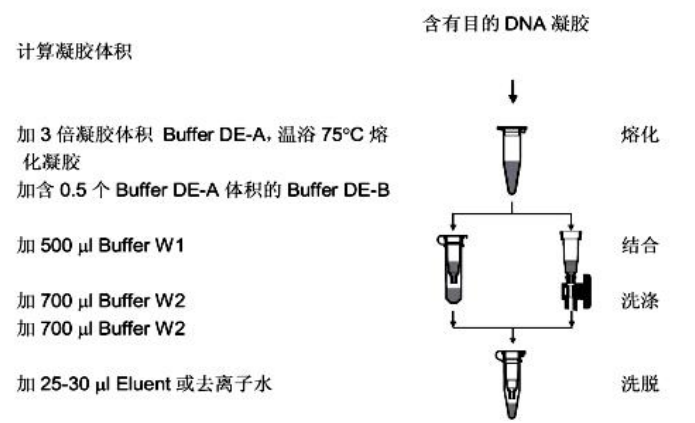
B. 负压法

- 5B. 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，开启负压装置，缓慢吸走管中溶液。
- 6B. 加 500 µl Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 7B. 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。
- 8B. 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒提供) 中，12,000×g 离心 1 min。

9. 将制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管中 (500T 规格自备)，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℃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℃加热2 min，慢慢冷却至室温，使单链DNA重新退火即可。