

UE DNA 凝胶回收大量试剂盒

本试剂盒适合从各种琼脂糖凝胶中回收多至 20 µg DNA (100 bp-15 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-MX-GX-10	UE-MX-GX-50	UE-MX-GX-250	UE-MX-GX-500
Kit size	10 preps	50 preps	250 preps	500 preps
Miniprep column B10	10	50	250	500
2 ml Collection tube	10	50	250	500
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 吸附柱膜上)。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 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) 步骤3之后混合液转移至吸附柱可以放置2-5 min；
 - 2) 步骤3之后混合液过柱离心之后将滤液再次重复离心；
 - 3) 加热洗脱液温度；
 - 4) 洗脱液体积二次重复洗脱。

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. 吸取步骤 3 中的混合液，转移至吸附柱 B10 (吸附柱放置于收集管中)，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
*吸附柱溶剂为 800 µl，若样品体积大于 800 µl，可分批加入。
5. 将吸附柱 B10 放回收集管中，加 500 µl Buffer W1，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。
6. 将吸附柱 B10 放回收集管中，加 700 µl Buffer W2，12,000 rpm 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 rpm 离心 1 min。
*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。
7. 将吸附柱 B10放回收集管中，12,000 rpm 离心1 min。
8. 将吸附柱置于洁净的离心管 (自备) 中，向吸附柱膜中央加50-100 µl Eluent 或去离子水，室温静置 1 min，12,000 rpm 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。
*如果需要较大 DNA 浓度，可以适当减少洗脱液的体积，2 次重复洗脱。

五、流程图

计算凝胶体积

含有目的DNA凝胶

加3倍凝胶体积Buffer DE-A，温浴75°C熔化凝胶
加含0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B

熔化

加500 µl Buffer W1
加700 µl Buffer W2
加700 µl Buffer W2

结合

洗涤

加50-100 µl Eluent或去离子水

洗脱

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熔化 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) 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。 2) 选用合适浓度的琼脂糖凝胶电泳，上样量不超过吸附柱的最大结合量（20 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洗涤后可将吸附柱离心时间由原来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 中完全熔化。 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。