

## 小片段 DNA 小量纯化试剂盒

### 一、产品简介

采用硅胶膜选择性吸附 DNA 的方法,能有效去除蛋白质、≤30 mer 引物、单核苷酸、染料和无机盐等杂质,不能去除引物二聚体。

适合从各种酶反应液或其他含 DNA 的溶液中浓缩、纯化≤20μg 长度介于 20 bp–10 kb 的 DNA 片段,回收率为 60-95%,最小洗脱体积 50 μl。纯化的 DNA 适用于酶切、连接、PCR 和测序等分子生物学实验。

### 有效回收量与起始样品量

本试剂盒有效回收量为4-20 μg 双链DNA。起始目的DNA量偏高或偏低都会降低回收率。

**PCR产物估算方法:** 通常PCR体系中上下游引物浓度各0.2 μM,理想条件下50%引物转化为目的产物,即0.1 μM;

100 bp目的产物为6.6 ng/μl; 500 bp目的产物为33 ng/μl; 1 kb目的产物为66 ng/μl,以此类推。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK414-01 (50 次)
Buffer SDB	15 ml
Buffer WB3 <sup>§</sup>	16 ml
DNA 吸附柱-A20	50 个
收集管	50 个×2
TE <sup>*</sup>	15 ml
1.5ml 离心管(用于洗脱)	50 个
说明书	1 份

<sup>§</sup>Buffer WB3: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇或者95%乙醇,混合均匀。

<sup>\*</sup>TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025%NaN<sub>3</sub>, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

### 三、产品选择指南

小量 DNA 纯化&回收系列试剂盒预期回收率, **1**为 DK414 预期回收率



#### 1 DK414 小片段 DNA 小量纯化试剂盒

特别适合从各种 DNA 反应液中回收小分子 DNA,不能去除引物二聚体

#### 2 DK403 琼脂糖凝胶 DNA 小量回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA,有效回收范围 50 bp-15 kb

#### 3 DK405 小量 DNA 快速回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA,有效回收范围 100 bp-15 kb  
从各种 DNA 反应液中回收 DNA,有效去除引物二聚体

#### 4 DK411 DNA产物小量纯化试剂盒

从各种 DNA 反应液中回收 DNA;  
有效回收范围 100 bp-10 kb,有效去除引物二聚体

### 四、注意事项

1. Buffer SDB 含刺激性化合物,避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛,应立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处,必要时寻求医疗咨询。
2. 使用后应及时盖紧试剂瓶盖,以免影响下次使用效果,尤其是 Buffer SDB 和添加乙醇后的 Buffer WB3。
5. 如回收的 DNA 后续用于连接和转化,建议将 TE 稀释 10 倍后用作洗脱液。TE 中含有 0.025% NaN<sub>3</sub>,会抑制细菌生长。

### 五、实验准备

1. 第一次使用前,按试剂瓶所示体积在 Buffer WB3 中加入无水乙醇或者 95%乙醇,混合均匀。
2. 可选: 50-70°C 预热 TE 或者去离子水 (pH≥7)。

## 六、操作步骤

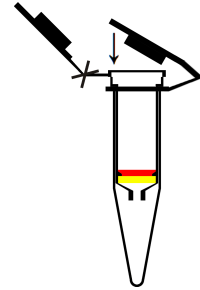
所有离心时间按使用台式快速离心机设定, 通常 10 秒内可达最高转速/离心力; 如使用慢升速离心机, 离心时间需延长 30 秒。

所有离心条件为室温, 12,000-16,000×g; 如离心机只能设定转速, 设定为低于最高转速 1,000 rpm。

1. 在酶反应液或其他含 DNA 的溶液中加入 **2 倍体积的 Buffer SDB**, 混合均匀, 离心 1 min。
2. 将离心上清转入 DNA 吸附柱-A20(置于收集管), 离心 1 min, 丢弃收集管。将 DNA 吸附柱-A4 放入另一个干净的收集管中。  
DNA 吸附柱-A20 最大柱体积为 750  $\mu$ l, 如溶液体积>750  $\mu$ l 应分次过柱;
3. 加入 **500  $\mu$ l Buffer WB**, 离心 1 min, 弃滤液, 将 DNA 吸附柱-A20 放回收集管中。
4. 重复步骤 3。
5. 离心 2 min。
6. 将 DNA 吸附柱-A20 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 $\geq$ 50  $\mu$ l TE 或去离子水(pH $\geq$ 7.0)

将 1.5 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上, 做好标记, 去除 DNA 吸附柱的盖子(B), 离心 1 min。

- ▲ 55-60 $^{\circ}$ C 预热 TE 或去离子水(pH $\geq$ 7.0), 可以提高洗脱效率。
- ▲ 如使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 $\geq$ 7.0。
- ▲ 目的片段 DNA 长度 $\geq$ 3kb, 建议重复洗脱, 以提高洗脱效率。重复洗脱的两种方法:
  - a. 洗脱的 DNA 溶液转入 DNA 吸附柱中进行洗脱, 获得的 DNA 浓度高于方法 b;
  - b. 重新加入洗脱液进行洗脱, 洗脱效率高于方法 a。



## 七、常见问题解答

### Q1 A260/230 比值不正常

A1.1 未准确调零, A260/230 比值为负值或极高或极低。需要用与洗脱 DNA 一致的缓冲液调零, 即用什么洗脱就用什么调零。

A1.2 DNA 浓度低于 20 ng/ $\mu$ l, 仪器偏差可能会出现 260/230 比值不正常。

### Q2 回收率很低或回收不到 DNA

A2.1 漂洗液 Buffer WB3 中未加乙醇, 或某次使用后未盖紧试剂瓶盖导致乙醇挥发。

A2.2 起始 DNA 量极少。微量分光光度计检测 DNA 浓度下限为 20 ng/ $\mu$ l; 琼脂糖凝胶电泳, EB 显色 dsDNA 下限为 10 ng。

### Q3 后续 DNA 连接或者酶切效率低

A3 步骤5离心时间不足 2 min, 未彻底去除 Buffer WB3(含乙醇, 乙醇会抑制连接和酶切等酶反应)。

## 八、回收率与估算方法:

样品回收前应少量留样(以下简称**回收前**), 与回收后的 DNA 按比例平行电泳, 估算回收率。

比如, PCR 产物起始体积为 40  $\mu$ l, 最终用 30  $\mu$ l TE 洗脱(以下简称**回收后**), 建议平行电泳体积为:

**回收后** 2  $\mu$ l, **回收前**  $100\% \times 40 \times 2 / 30 = 2.7 \mu$ l(相当于 100%回收率), **回收前**  $75\% \times 40 \times 2 / 30 = 2 \mu$ l(相当于 75%回收率)

### 两种典型的回收产物分析

**PCR 产物:** 含有 dNTP、引物、非特异性扩增产物包括引物二聚体、降解的模板 DNA 在 260nm 都有吸收峰;

因此 PCR 产物直接测浓度没有任何意义, 也不能作为计算回收率的标准。

**质粒酶切产物:** 以下因素会影响酶切后目的条带的含量:

- 1、基因组 DNA 和 RNA 残留, 尤其是 RNA 需短时间电泳才能明显观察到, 而且 RNA 降解后 A260 升高(增色效应);
- 2、质粒的构型: 变性为单链的质粒不能被切开, 已断裂为线性的质粒酶切后呈涂抹带。
- 3、酶切不完全或内切酶星号活性, 使目的产物的量减少。

因此, 质粒酶切产物的回收也要电泳验证, 应以酶切产物作为标准进行电泳。