

## 96 微量 DNA 快速回收试剂盒

### 一、产品简介

本试剂盒适合从TAE、TBE琼脂糖凝胶中回收DNA，有效回收DNA长度范围100 bp-15 kb，回收率为60-90%(见page4-4图1)，获得的DNA适用于酶切、连接、PCR和测序等分子生物学实验。

方法简便，只需溶胶→结合→洗涤→甩干乙醇→洗脱5个步骤。

结果稳定，凝胶种类、凝胶浓度和切胶重量等因素对回收率无明显影响(见page4-4图2)。

本试剂盒使用 **96 DNA 吸附板-A4** 回收 DNA，完全避免个别孔可能被堵塞的情况，确保样品提取的均一性。每个孔最大吸附量为 4 μg DNA，最小洗脱体积为 25 μl，最大洗脱总体积为 140 μl。

### 有效回收量与起始样品量

本试剂盒有效回收量为0.5-4 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。

**质粒酶切产物估算方法：**目的DNA量= 起始质粒DNA量 × 酶切后目的DNA长度 ÷ 质粒DNA长度

质粒DNA的纯度、构型和酶切效率会影响起始DNA量的估算。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK491-2 (×96)	原理与用途
Buffer PG <sup>□</sup>	80 ml×2	溶胶
Buffer WB3 <sup>§</sup>	65 ml	洗涤去盐
96 DNA 吸附柱-A4	2 块	选择性吸附 DNA
96 深孔板	4 块	接收废液
96 U 型板	2 块	接收洗脱的 DNA
不干胶片	4 张	密封 96 孔板，保存 DNA
TE <sup>*</sup>	30 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	

<sup>□</sup>Buffer PG: 储存温度低于10℃时，可能会析出不溶物，需37-56℃加热溶解；不能使用更高温度加热，不然试剂瓶会变形。

<sup>§</sup>Buffer WB3: 第一次使用前，按试剂瓶所示体积加入无水乙醇，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℃)。

所有组成成分于室温储存。

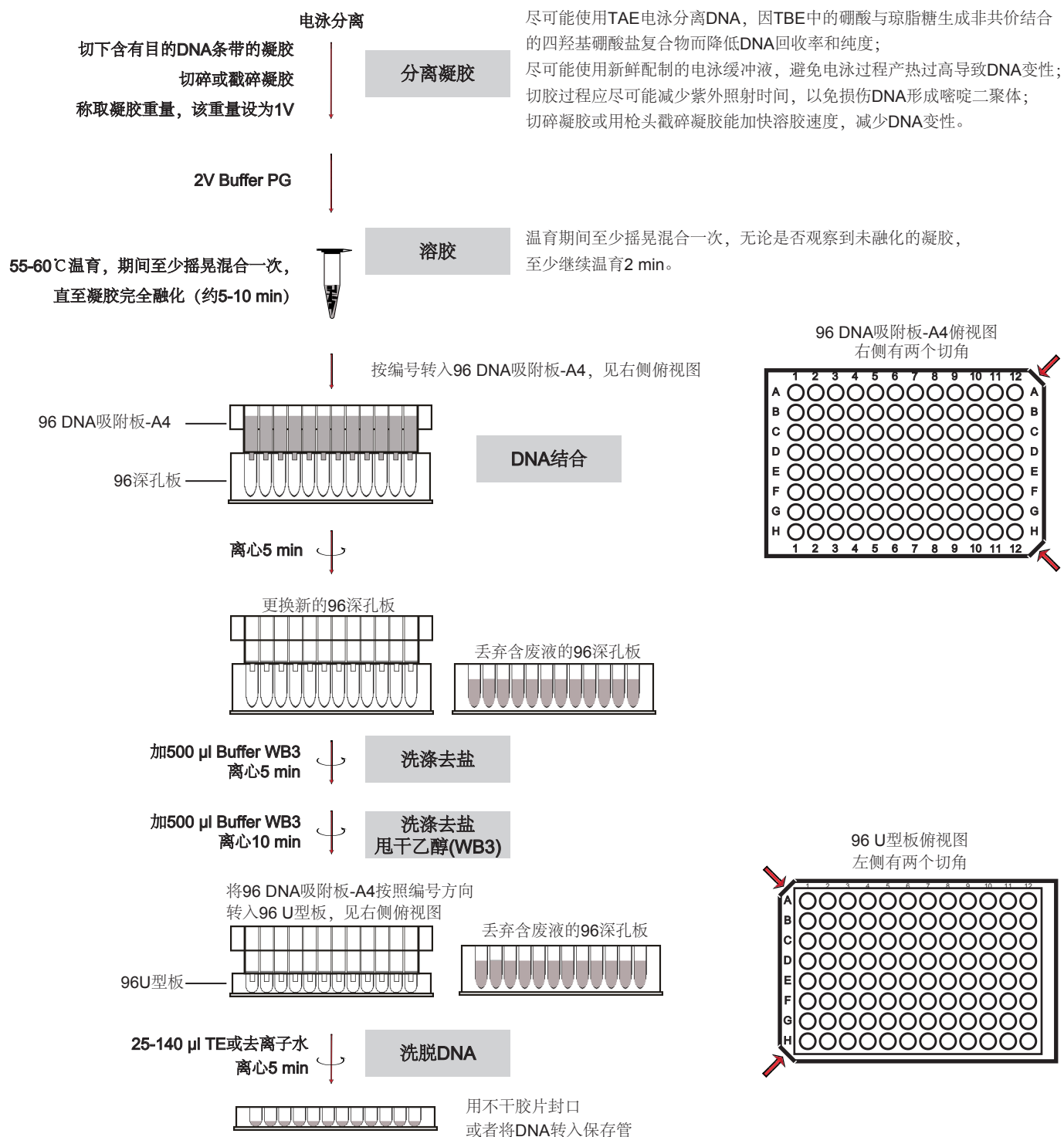
### 三、注意事项

1. Buffer PG 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，尤其是添加乙醇后的 Buffer WB3。
3. 建议使用 TAE 电泳分离 DNA，因 TBE 中的硼酸与琼脂糖生成非共价结合的四羟基硼酸盐复合物而降低 DNA 回收率和纯度。
4. 凝胶中含有 EB 等核酸染料，操作步骤 1-3 应避免皮肤、衣服和实验器材接触凝胶和融化的凝胶。
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。

### 四、实验准备

1. 55-60℃水浴或温箱。
2. 储存温度低于 10℃时，Buffer PG 可能会析出不溶物，需 37-56℃加热溶解；不能使用更高温度加热，不然试剂瓶会变形。
3. 55-60℃预热 TE 或去离子水(pH≥7.0)。
4. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB3 中加入无水乙醇，混合均匀。

## 五、操作流程示意图



## 六、操作步骤

所有离心条件为：吊篮式水平转子，室温 2,500×g；如果离心力偏低，不利于溶液滤过，最终获得的 DNA 有明显盐和乙醇残留；如果离心力偏高，塑料耗材可能会变形甚至破裂。计速为 rpm 的离心机，按公式计算所需转速：

$$\text{转速(rpm)} = \frac{15007}{\sqrt{R}} \quad R \text{ 为转子半径, 单位 cm.}$$

1. 切下含目的 DNA 的凝胶，称取凝胶重量，该重量作为一个凝胶体积。例如：100 mg = 100 μl 体积。

▲ 为方便后续步骤操作，凝胶重量尽可能不超过 400 mg。

2. 加入 2 个凝胶体积的 Buffer PG，放入 55-60℃ 水浴或温箱，温育期间至少摇晃混合一次，直至凝胶完全融化（约 5-10 min）。

▲ Buffer PG 体积偏差-20%~+50%不影响使用效果，例如：100mg 凝胶可加入 160~300 μl Buffer PG。

▲ 为保证凝胶完全融化，温育期间摇晃混合后无论是否观察到未融化的凝胶，至少继续温育 2 min。

3. 将 96 DNA 吸附板-A4 置于 96 深孔板上，将步骤 2 中的溶液按编号转入 96 DNA 吸附板-A4 对应的孔中。

每个孔加样体积不能超过 1.2 ml，不然后续离心步骤会出现交叉污染；

如果溶液体积超过 1.2 ml(即起始凝胶重量超过 400 mg)，应分次转入 96 DNA 吸附板-A4，每次加样体积不超过 1.2 ml；

如果 96 DNA 吸附板-A4 上平面沾染溶液，用干净的吸水纸擦干。

4. 将 96 DNA 吸附板-A4 连同 96 深孔板放入吊篮式水平转子，离心 5 min。

5. 将 96 DNA 吸附板-A4 转入另外一块干净的 96 深孔板，在 96 DNA 吸附板-A4 每个孔中加入 500 μl Buffer WB3，离心 5 min。

6. 在 96 DNA 吸附板-A4 每个孔中加入 500 μl Buffer WB3，离心 10 min。

7. 将 96 DNA 吸附板-A4 按照编号方向转入 96 U 型板，每孔中加入 25-140 μl 56-60℃ 预热的 TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 5 min。

加入洗脱液体积为 25-100 μl，需将洗脱液准确加在硅胶膜中央；加入洗脱液体积为 100-140 μl，无需注意加样的位置。

## 七、常见问题解答

### Q1 A260/230 比值不正常

A1.1 未准确调零。这种情况下 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，即用什麼洗脱就用什麼调零。

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

A1.3 盐残留。琼脂糖凝胶未完全融化，可能会导致盐残留。

A1.4 琼脂糖残留。琼脂糖质量差或使用 TBE 凝胶分离 DNA，可能会出现琼脂糖残留，此时 255nm 和 260nm 出现双吸收峰，A260/230 比值小于 2.0。  
琼脂糖残留不影响后续 PCR、酶切和连接等反应。

### 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 琼脂糖凝胶未完全融化，堵塞 96-DNA 吸附板中的硅胶材料，导致 DNA 不能被有效吸附和洗脱。

A2.3 起始 DNA 量极少。一般微量分光光度计检测 DNA 浓度下限为 20 ng/μl；琼脂糖凝胶电泳，EB 显色 dsDNA 下限为 10 ng。

A2.4 DNA 变性(见 A4.1)。单链 DNA 不能与 EB 等核酸染料有效结合；此情况下分光光度计能检测到 DNA，但电泳检测不到 DNA。

### Q3 后续 DNA 连接或者酶切效率低

A3.1 步骤6离心时间不足 10 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)。

A3.2 DNA 变性(见 A4.1)。

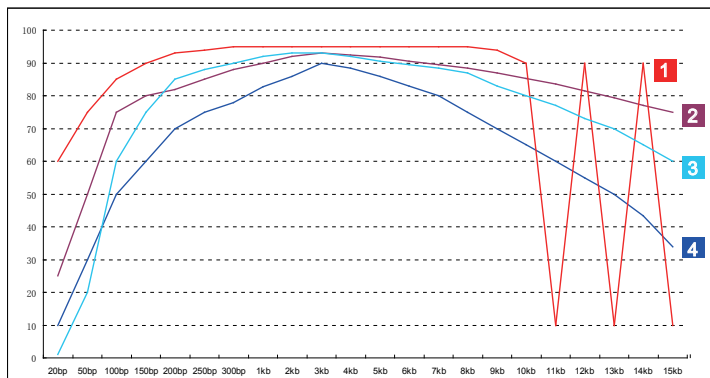
### Q4 回收的 DNA 鉴定目的条带弥散或多出现一个条带

A4.1 DNA 变性，额外多出比目的片段“小”的条带。电泳缓冲液反复使用多次，电泳过程产热过高导致 DNA 变性。

A4.2 使用 TBE 凝胶电泳分离 DNA，残留的硼酸与琼脂糖复合物降低部分 DNA 迁移率，额外多出比目的片段“大”的条带。

## 八. 回收率与估算方法:

↓ 图 1. 微量 DNA 纯化&回收系列试剂盒预期回收率, 3 为 DK491 预期回收率



### 1 DK412 小片段 DNA 微量纯化试剂盒

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 DK402 琼脂糖凝胶 DNA 微量回收试剂盒

从琼脂糖凝胶中回收 DNA, 有效回收范围 50 bp-15 kb

### 3 DK404 微量 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

### 3 DK491 96 微量 DNA 快速回收试剂盒

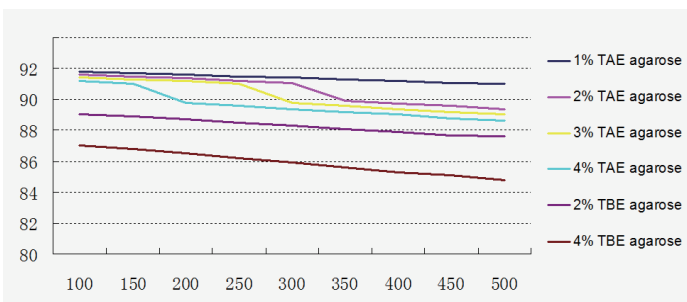
从琼脂糖凝胶中回收 DNA, 有效回收范围 100 bp-15 kb

### 4 DK413 DNA 产物微量纯化试剂盒

### 4 DK494 96 DNA 产物微量纯化试剂盒

从各种 DNA 反应液中回收 DNA, 有效去除引物二聚体

↓ 图 2. 以 1 μg 500 bp DNA 片段为起始样品, 使用 DK404/DK491 回收目的 DNA 的回收率



回收率与目的 DNA 长度和起始量有关, 但“回收率不稳定”通常与凝胶种类、凝胶浓度和凝胶重量有关。

我们考察了上述因素, 使用 DK404 和 DK491 均可获得稳定的回收率。

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 产物电泳分离加样量为 40 μl, 最终用 30 μl TE 洗脱(以下简称“回收后”), 建议平行电泳体积为:

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

## 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。