

## 96 DNA 产物微量纯化试剂盒

### 一、产品简介

采用硅胶膜选择性吸附 DNA 的方法, 适合从各种酶反应液中回收 DNA, 有效去除蛋白质、引物、引物二聚体、单核苷酸、染料和无机盐等杂质; 有效回收 100 bp- 10 kb DNA 片段, 回收率为 60-90%(见图 1); 纯化的 DNA 适合用于酶切、连接、PCR 和测序等分子生物学实验。

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。

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK494-2 (×96)	原理与用途
Buffer PD	30 ml	调整结合条件
Buffer WB <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 WB: 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°C)。

所有组成成分于室温储存。

### 三、产品选择指南

微量 DNA 纯化&回收系列试剂盒预期回收率, 4 为 DK494 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

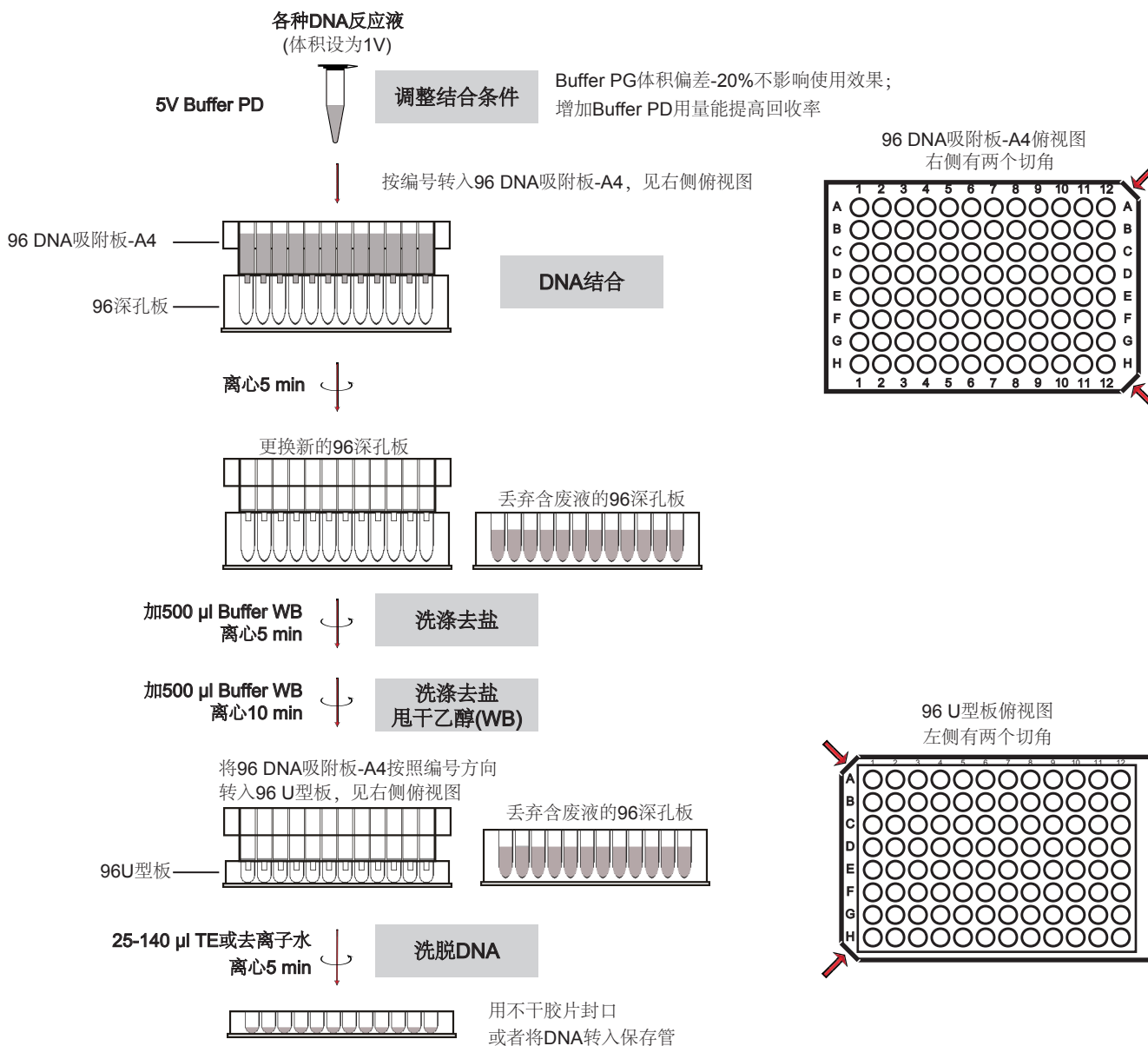
#### 四、注意事项

1. Buffer PD 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，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，尤其是 Buffer PD 和添加乙醇后的 Buffer WB，以免影响下次使用效果。
3. 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%  $\text{NaN}_3$ ，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 WB 中加入无水乙醇，混合均匀。
2. 可选：50-70°C 预热 TE 或去离子水 ( $\text{pH} \geq 7$ )。

#### 六、操作流程示意图



## 七、操作步骤

所有离心条件为：吊篮式水平转子，室温 2,500×g；如离心力偏低，不利于溶液滤过，最终获得的 DNA 有明显的蛋白、盐和乙醇残留；

如离心力偏高，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. 在酶反应液或其他含 DNA 的溶液中加入 **5 倍体积的 Buffer PD**，**翻转混合均匀或反复吹打 3 次混合均匀。**

▲ Buffer PD 体积-20%不影响使用效果，增加 Buffer PD 用量可提高回收率。

2. 将 **96 DNA 吸附板-A4** 置于 **96 深孔板** 上，将步骤 1 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，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。

3. 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。

4. 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 WB**，离心 5 min。

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

6. 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°C 预热的 TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 5 min。

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

## 八、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 what 洗脱就用 what 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。

### Q2 回收率很低或回收不到 DNA

A2.1 漂洗液 Buffer WB 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。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。

### Q3 后续 DNA 连接或者酶切效率低

A3 步骤5离心时间不足10 min，未彻底去除Buffer WB(含乙醇，乙醇会抑制连接和酶切等酶反应)。

## 九. 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 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：

**回收后** 2 μl，**回收前** 100%\*40\*2/30=2.7 μl(相当于 100%回收率)，**回收前** 75%\*40\*2/30=2 μl(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。