

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%; 纯化的 DNA 适合用于酶切、连接、PCR 和测序等分子生物学实验。

使用 DNA 吸附柱-A4 回收 DNA, 最大回收量 4 µg, 最小洗脱体积 15 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	DK413-01 (50 次)	DK413-02 (200 次)
Buffer PD	30 ml	120 ml
Buffer WB [§]	16 ml	65 ml
DNA 吸附柱-A4	50 个	200 个
收集管	50 个×2	200 个×2
TE [*]	15 ml	30 ml
1.5ml 离心管(用于洗脱)	50 个	200 个
说明书	1 份	1 份

[§] 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。

^{*} TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.025% NaN₃, 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

微量 DNA 纯化&回收系列试剂盒预期回收率, **4** 为 DK413 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% NaN₃, 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。

DNA 吸附柱-A4 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中，不影响使用效果。

1. 在酶反应液或其他含 DNA 的溶液中加入 **5 倍体积的 Buffer PD**，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. 将步骤 1 中的溶液转入 DNA 吸附柱-A4(置于收集管)中，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-A4 最大柱体积为 900 μl，如溶液体积 >900 μl 应分次过柱；

如过柱体积 >750 μl，离心后 DNA 吸附柱-A4 底部会接触滤液，溶液不能完全滤过，需倒弃滤液后再次离心。

3. 加入 **500 μl Buffer WB**，离心 1 min，弃滤液，将 DNA 吸附柱-A4 放回收集管中。

4. 加入 **100 μl Buffer WB**，离心 2 min。

5. 将 DNA 吸附柱-A4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 $\geq 15 \mu\text{l}$ TE 或去离子水(pH ≥ 7.0)，离心 1 min。

▲ 55-60℃ 预热 TE 或去离子水(pH ≥ 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 ≥ 7.0 。

▲ 目的片段 DNA 长度 $\geq 3\text{kb}$ ，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/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。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4离心时间不足 2 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)。

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