

小片段 DNA 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,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≤4 μg 长度介于 20 bp–10 kb 的 DNA 片段,回收率为 60-95%,最小洗脱体积 15 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 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	DK412-01 (50 次)	DK412-02 (200 次)
Buffer SDB	15 ml	60 ml
Buffer WB3 [§]	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

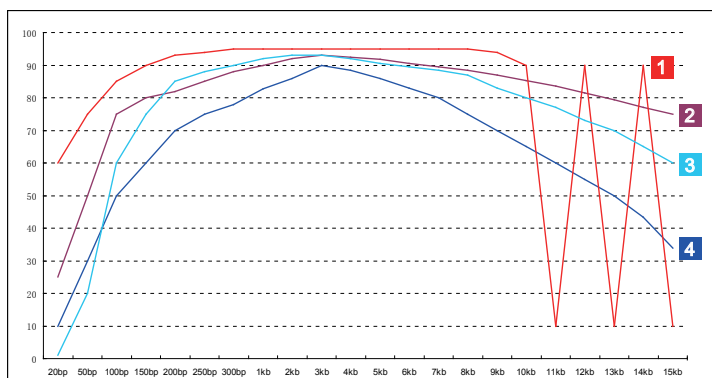
[§]Buffer WB3: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇或者 95% 乙醇,混合均匀。

^{*}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, **1** 为 DK412 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 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% 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 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。

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 **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-A4(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-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 WB3**，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 WB3**，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 ≥15 μl 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 ≥ 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。

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/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 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 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。