

AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒

本试剂盒适合从各种琼脂糖凝胶中回收多至 8 μ g DNA (70bp-10Kb)，回收率为 60-85%。琼脂糖凝胶在温和的缓冲液(DE-A 溶液)中熔化，其中的保护剂能防止线状 DNA 在高温下降解，然后在 DE-B 溶液的作用下使 DNA 选择性结合到膜上。纯化的 DNA 纯度高，并保持片段完整性和高生物活性，可直接用于连接、体外转录、PCR 扩增、测序、微注射等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-GX-4	AP-GX-50	AP-GX-250
制备次数	4 preps	50 preps	250 preps
制备管	4	50	250
2 ml 离心管	4	50	250
1.5 ml 离心管	4	50	250
Buffer DE-A	6 ml	2 \times 33 ml	2 \times 165 ml
Buffer DE-B	3 ml	33 ml	165 ml
Buffer W1	2.8 ml	28 ml	135 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml	2 \times 72 ml
Eluent	1 ml	5 ml	25 ml
说明书	1	1	1

Buffer DE-A: 凝胶熔化剂，含 DNA 保护剂，防止 DNA 在高温下降解。室温密闭贮存。

Buffer DE-B: 结合液（促使大于 70bp 的 DNA 片段选择性结合到 DNA 制备膜上）。室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液，室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液，使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（用 100%乙醇或 95%乙醇），混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent: 洗脱液，室温密闭贮存。

二、注意事项

1. Buffer DE-A(含有 β -巯基乙醇)、Buffer DE-B 和 Buffer W1 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。
2. 在步骤 1 中，将凝胶切成细小的碎块可大大缩短凝胶熔化时间（线型 DNA 长时间暴露在高温条件下易于水解），从而提高回收率。勿将含 DNA 的凝胶长时间地暴露在紫外灯下，减少紫外线对 DNA 造成的损伤。

3. 在步骤 2 中凝胶必须完全熔化，否则将严重影响 DNA 回收率。
4. 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C，有利于提高洗脱效率。
5. DNA 分子呈酸性，建议在 2.5 mM Tris-HCl, pH 7.0-8.5 洗脱液中保存。

三、实验准备

1. 第一次使用前，Buffer W2 concentrate 中加入指定体积的无水乙醇。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
3. 准备 75°C 水浴。
4. 使用前，检查 Buffer DE-B 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 70°C 温浴加热熔化并冷却至室温后再使用。

四、操作步骤

1. 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量（提前记录 1.5 ml 离心管重量），该重量作为一个凝胶体积（如 100 mg=100 μ l 体积）。
2. 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A，混合均匀后于 75°C 加热（低熔点琼脂糖凝胶于 40°C 加热），间断混合（每 2-3 min），直至凝胶块完全熔化（约 6-8 min）。
* Buffer DE-A 为红色溶液。在熔化凝胶的过程中，可以帮助观察凝胶是否完全熔化。
3. 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B，混合均匀。当分离的 DNA 片段小于 400bp 时，需再加入 1 个凝胶体积的异丙醇。
* 加 Buffer DE-B 后混合物颜色变为黄色，充分混匀以保证形成均一的黄色溶液。

步骤 4-6 可以选择负压法或离心法。

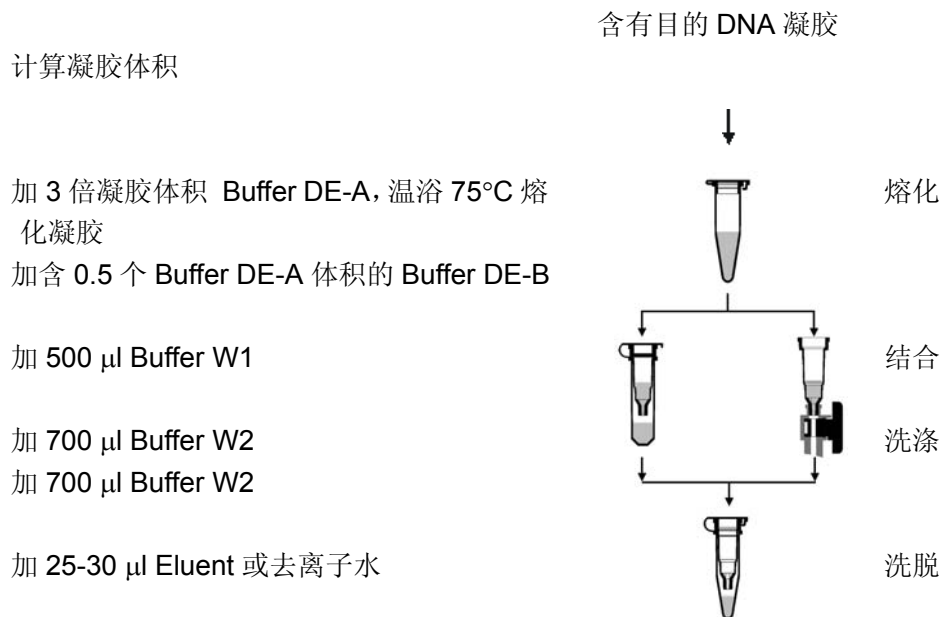
A. 负压法

- 4A. 正确连接负压装置，将 DNA 制备管插到负压装置的插口上。吸取步骤 3 中的混合液，转移到制备管中，开启并调节负压至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
- 5A. 加 500 μ l Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 6A. 加 700 μ l Buffer W2，吸尽管中溶液。以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
* 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对后续实验的影响。
- 7A. 将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒提供）中，12,000 \times g 离心 1 min。

B. 离心法

- 4B. 吸取步骤 3 中的混合液，转移到 DNA 制备管（置于 2 ml（试剂盒内提供）离心管）中， $12,000\times g$ 离心 1 min。弃滤液。
- 5B. 将制备管置回 2 ml 离心管，加 500 μl Buffer W1， $12,000\times g$ 离心 30 s，弃滤液。
- 6B. 将制备管置回 2 ml 离心管，加 700 μl Buffer W2， $12,000\times g$ 离心 30 s，弃滤液。以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次 $12,000\times g$ 离心 1 min。
- * 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
 - * 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对后续实验的影响。
- 7B. 将制备管置回 2 ml 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 min。
8. 将制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管(试剂盒内提供)中，在制备膜中央加 25-30 μl Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。 $12,000\times g$ 离心 1 min 洗脱 DNA。
- * 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 将提高洗脱效率。

五、流程图



六、常见问题分析

主要问题	原因	建议
回收率低	1. 目的片段结合量低 1) 琼脂糖凝胶未完全熔化时目的片段只有部分结合到膜上，导致其余的片段在后续洗涤过程中丢失以及出现制备管堵塞现象，最终影响回收效率。 2) 小于 400bp 的片段未加异丙醇 3) 电泳缓冲液 pH 值过高，影响目的片段的结合	在切胶时尽可能去除不含目的片段的琼脂糖，确保 buffer DE-A 的正确用量。在熔胶过程中要仔细检查确保无固体琼脂糖残留，间隔性的对样品进行摇晃促进凝胶的充分熔化。 务必确保已加入 1 倍凝胶体积的异丙醇（100%）。 建议加入 10 μ l 3M NaAC 中和。
	2. 结合的 DNA 片段过早的洗脱 Buffer W2 中未加无水乙醇或者乙醇浓度不是 95 - 100%的	确保加入正确的乙醇量。每次使用后应拧紧瓶盖，以免乙醇挥发，降低回收率。
	3. 洗脱效率低	最后一次 Buffer W2 洗涤完后不要将制备管放于负压装置上抽得过干。 洗脱液或者去离子水 65 $^{\circ}$ C 预热以及增加洗脱前静置时间至 5min，都可提高洗脱效率。 选用合适浓度的琼脂糖凝胶电泳，上样量不超过制备管的最大结合量（8 μ g）。
后续酶促反应不理想	1. 盐污染 2. 乙醇污染 3. 琼脂糖残留 4. 洗脱产物中含有 ssDNA	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将制备管离心时间由原来 1min 增加至 2min。 切胶时尽可能去除不含有 DNA 片段部分的凝胶以便于对琼脂糖的处理，确保琼脂糖块在 Buffer DE-A 中完全熔化。 将洗脱产物 95 $^{\circ}$ C 加热 2min，慢慢冷却至室温，使单链 DNA 重新退火即可。