

AxyPrep-96 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 g 长度在 70 bp-10 kb 的片段，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 选择性地结合到膜上。

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-96-GX-1	AP-96-GX-4	AP-96-GX-24
制备次数	1×96 prep	4×96 preps	24×96 preps
96-well DNA plate- A	1	4	24
96-well 2.2 ml growblock	2	8	48
96-well V-bottom sample plate	1	4	24
Adhesive film	3	15	75
Silicone mat	1	4	24
Buffer DE-A	40 ml	165 ml	2×480 ml
Buffer DE-B	29 ml	80 ml	480 ml
Buffer W2 concentrate	72 ml	2×72 ml	6×150 ml
Eluent	10 ml	25 ml	110 ml
说明书	1	1	1

96-well DNA plate- A: 96 孔 DNA 制备板。

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 W2 concentrate: 去盐液。首次使用前，必须按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100% 乙醇或 95% 乙醇），充分混合后使用。每次使用后需将瓶盖盖紧，以保持 W2 中的乙醇含量。

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）和 Buffer DE-B 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和防护眼镜，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（线性 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. DNA 分子呈酸性，建议在 2.5 mM Tris-HCl, pH7.0-8.5 的洗脱液中保存。

三、实验准备

1. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头。

2. 第一次使用前，在 **Buffer W2 concentrate** 中加入指定体积的无水乙醇。
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 **75 °C** 温浴加热至沉淀完全溶解并冷却至室温后再使用。

四、操作步骤

1. 用干净锋利的刀片从琼脂糖凝胶中切下含有目的 **DNA** 条带的凝胶块，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量，该重量作为一个凝胶体积（如 **100 mg=100 l** 体积），然后依次放入 **96** 孔 **2.2 ml** 深孔板（试剂盒内提供）孔中。
 - * 观察 **DNA** 条带位置时，请尽可能缩短紫外照射时间，以减少紫外诱导突变。电泳时间可适当延长，从而使目的 **DNA** 片段与其他 **DNA** 片段尽可能分开，从而提高回收纯度。
2. 加入 **3** 个凝胶体积的 **Buffer DE-A**，用硅胶片密封各孔（试剂盒内提供），混合均匀后于 **75 °C** 温浴，间断混合（每 **3-5 min**），直至凝胶块完全熔化（**15 min** 左右）。**3,000×g** 简短离心使硅胶片上的溶液到 **96** 深孔板中。
 - * 温浴及混匀过程中，要确保硅胶片与深孔板贴紧，以免孔间样品污染。
 - * **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. 弃硅胶片。每孔加 **0.5** 个 **Buffer DE-A** 体积的 **Buffer DE-B**，用不干胶片（试剂盒内提供）密封各孔，混合均匀。**3,000×g** 简短离心使不干胶片上的溶液到 **96** 深孔板中。当分离的 **DNA** 片段小于 **400 bp** 时，应在此溶液中再加入 **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。
4. 将 **96** 孔 **DNA** 制备板（试剂盒内提供）置于新的 **96** 孔 **2.2 ml** 深孔板（试剂盒内提供）上，然后将样品转移至 **96** 孔 **DNA** 制备板中，用不干胶片密封各孔，**3,000×g** 离心 **5 min**，弃滤液。
5. 将 **96** 孔 **DNA** 制备板置回深孔板上，每孔加 **800 μl Buffer W2**，**3,000×g** 离心 **1 min**，弃滤液；以同样的方法，再用 **800 μl Buffer W2** 洗涤一次，**3,000×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。
 - * 两次用 **Buffer W2** 冲洗能确保盐分被完全清除，消除对后续反应的影响。
6. 将 **96** 孔 **DNA** 制备板置回 **96** 孔 **2.2ml** 深孔板上，**3,000×g** 离心 **5 min**。
7. 将 **96** 孔 **DNA** 制备板置于洁净的 **96** 孔 **V** 型底板（试剂盒内提供）上，在膜正中央加 **50 μl Eluent** 或去离子水，用不干胶片密封各孔，室温静置 **5 min**。**3,000×g** 室温离心 **5 min** 洗脱 **DNA**。
 - * 将 **Eluent** 或去离子水加热至 **65°C**，可提高洗脱效率。

五、流程图

计算凝胶体积

加 3 倍凝胶体积的 Buffer DE-A, 75 °C 温浴融化凝胶
加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B

上柱吸附 DNA (3,000xg, 5 min)

800 μ l Buffer W2, 两次 (3,000xg, 1 min)
3,000xg, 5 min。

50 μ l Eluent 或去离子水, 室温 5 min; 3,000xg, 5 min。

