

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
用户需自备的试剂与物品	1
技术支持	1
质量保证	1
注意事项	2
产品介绍	2
操作步骤分析与说明	2
起始样本	2
柱纯化技术	2
DNA 结合	2
洗涤	2
高速空离	3
洗脱 DNA	3
回收的 DNA 纯度	3
使用前准备	3
操作流程图示	4
凝胶 DNA 回收试剂盒操作步骤	5
DNA 纯化试剂盒操作步骤	7
常见问题分析	9
附录 1: 用凝胶 DNA 回收试剂盒从大于 500 mg 的凝胶中回收 DNA	10
附录 2: 用凝胶 DNA 回收试剂盒清洁回收 DNA	11
附录 3: 用 DNA 纯化试剂盒从蛋白酶 K 消化产物中回收 DNA	12
使用 Simgen 凝胶 DNA 回收试剂盒&DNA 纯化试剂盒发表的部分论文	13

产品组成

凝胶 DNA 回收试剂盒 Cat. No.	5 次样品 2001005	50 次制备 2001050	250 次制备 2001250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
1.5 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
Buffer G	3 ml	30 ml	150 ml
Buffer WS	3 ml	30 ml	150 ml
Buffer WG (浓缩液)	2 ml	17 ml	40 ml×2
Buffer TE	0.5 ml	5 ml	25 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

DNA 纯化试剂盒 Cat. No.	5 次样品 2101005	50 次制备 2101050	250 次制备 2101250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
Buffer P	3 ml	30 ml	75 ml×2
Buffer WB (浓缩液)	1.5 ml	12 ml	60 ml
Buffer TE	0.5 ml	5 ml	25 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品储存与有效期

产品储存于常温（0~30℃），可在三年内保持使用性能无明显变化。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性乳胶手套等防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 水浴锅（仅凝胶 DNA 回收试剂盒需要）
6. 可能需要异丙醇、3 M 乙酸钠（pH 5.2）

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

质量保证

杭州新景生物试剂开发有限公司保证提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求（注意：如果经过鉴定是因为客户的错误操作所导致的实验失败，我公司只能提供相应的补救措施，保留不予更换的权利）。

注意事项

Buffer G、Buffer WS 和 Buffer P 均含刺激性化合物，操作时请戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗咨询。

产品介绍

凝胶 DNA 回收试剂盒适合从多至 500 mg 用 TAE 或 TBE 缓冲液配制的普通/低熔点琼脂糖凝胶中回收多至 20 µg DNA (70 bp-15 kb)，回收率为 70%~85%。溶胶试剂为不含碘化钠的温和溶解液，确保回收的 DNA 保持片段完整性和高生物学活性，Buffer WS 和 Buffer WG 两种洗液的双重洗涤，最大程度地降低了回收的 DNA 中的盐分残留，确保可直接用于连接、体外转录、PCR 扩增、测序、微注射等分子生物学实验。

DNA 纯化试剂盒适合从 PCR、酶促反应、测序反应的反应液中纯化回收多至 25 µg 高纯度 DNA (50 bp-10 kb)，回收效率在 75%~90% 之间，纯化后的 DNA 中不含引物、酶蛋白、单核苷酸、荧光染料或放射性同位素标记的单核苷酸。适用于各种要求的分子生物学实验。

操作步骤分析与说明

1. 起始样本

1) 凝胶 DNA 回收试剂盒适合从琼脂糖凝胶中回收特定长度的 DNA 片段。需要注意的是当回收的 DNA 片段大于 10 kb 时，DNA 的回收效率会降低，并可能导致回收的 DNA 出现断裂。当回收的 DNA 片段大于 15 kb 时我们推荐使用凝胶大片段 DNA (10-50 kb) 回收试剂盒 (Cat. No.: 2013050)。当回收的 DNA 片段太短时，例如 50 bp，凝胶 DNA 回收试剂盒也能回收，只是回收效率会低于 20%，若省略 Buffer WS 洗涤步骤可提高回收效率至 30% 以上。

2) DNA 纯化试剂盒适合从含有 DNA 的溶液中清洁回收 DNA，最常用的是 PCR 扩增产物和各种酶促反应液 (比如限制性内切酶消化、蛋白酶 K 消化等)。DNA 纯化试剂盒能有效地清除酶、多肽、单核苷酸等杂质，但不能识别、清除引物二聚体和非特异性扩增产物。如果要清除引物二聚体或长度 < 200 bp 的非特异性扩增产物，推荐使用大片段 DNA 筛选试剂盒 (Cat. No.: 2105050)。如果要清除的非特异性扩增产物长度 ≥ 200 bp，请将 PCR 产物电泳后选用凝胶 DNA 回收试剂盒回收 DNA。如果从毛发、血迹等物证的蛋白酶 K 消化产物中回收微量的 DNA，请选用微量 DNA 清洁试剂盒 (Cat. No.: 2103050)。

2. 柱纯化技术

1) DNA 结合

Buffer G 加入凝胶块/待纯化的 DNA 溶液中或 Buffer P 加入待纯化的 DNA 溶液后，能调整样本中的盐离子浓度和 pH 值，使 DNA 易于结合到纯化柱的硅胶膜上。此时将样本溶液加入纯化柱中离心数秒，即可使 DNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，不需要的引物、盐分、酶、单核苷酸、琼脂糖分子、核酸染料、石蜡油、DMSO、Tween-20 等抑制下游分子生物学反应的杂质均被过滤除去。Buffer G 和 Buffer P 中均含有 pH 指示剂，以便于观察溶液中的 pH 值变化，或判断凝胶块的溶解情况。如果凝胶或待纯化的 DNA 溶液碱性过强，溶液可能会由黄色变为橙红色或紫红色，此时应加入约 10 µl 3 M 乙酸钠 (pH 5.2)，使溶液恢复到原来的黄色。

2) 洗涤

洗涤步骤主要是洗去残留在纯化柱上的盐分。如果要求最大限度地降低获得的 DNA 中的盐分残留，可在加入 Buffer WG 或者 Buffer WB 后室温静置 3-5 分钟再离心，以获得最佳的洗涤盐分效果。

DNA 结合、洗涤的过程只需要使溶液滤过纯化柱即可，因此对离心速度和离心时间并无严格的要求，可以选用离心机中的“short run”或“quick”模式运行以节约操作时间。

3) 高速空离

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 空离 1 分钟（如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，我们建议至少使用 12000-13000 rpm 离心 2 分钟）的作用：

- A. 使 Buffer WG 或 Buffer WB 被充分地离心除去。
- B. 在丢弃 Buffer WG 或 Buffer WB 滤液的过程中，如果有滤液不慎沾染到纯化柱上，也可被离心除去。

4) 洗脱 DNA

- A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 Buffer TE（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）洗脱 DNA，以便于 DNA 的长期稳定储存；也可以用去离子水洗脱 DNA，但是应确保去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。
- B. 增加用于洗脱 DNA 的 Buffer TE 或去离子水的体积可以提高 DNA 的回收效率；减少洗脱体积可以提高回收的 DNA 浓度。但如果用于洗脱 DNA 的 Buffer TE 或者去离子水体积少于 25 μ l，可能会导致洗脱液无法润透硅胶膜，反而降低 DNA 的回收效率。如果需要用更少洗脱体积来提高 DNA 浓度，推荐使用超薄凝胶 DNA 回收试剂盒（Cat. No.: 2002050）和超薄 DNA 纯化试剂盒（Cat. No.: 2102050）。
- C. 当使用 25-30 μ l 微量体积洗脱 DNA 时，应将 Buffer TE 或去离子水加到硅胶膜正中间，以确保硅胶膜完全被浸润，否则将使 DNA 的回收效率降低。
- D. 洗脱 DNA 前将 Buffer TE 或者去离子水预热到 50°C 能提高 DNA 的洗脱效率。
- E. 将 Buffer TE 或者去离子水加入纯化柱后延长静置的时间（延长至 3-5 分钟）能提高 DNA 的洗脱效率。
- F. 高速空离后的纯化柱可直接加入 Buffer TE 洗脱 DNA，无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇，过度干燥的纯化柱会不利于 DNA 的洗脱。
- G. 为了产品使用的安全，如果离心机没有防泄漏的盖子，我们建议将洗脱 DNA 的条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以防止 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

3. 回收的 DNA 纯度

正常操作条件下用柱纯化技术所获得的 DNA 的 A260/A280 均在 1.7-1.9 之间，可直接用于各种分子生物学实验。如果要测试 DNA 的纯度，为了精确估算，260 nm 的吸光值应处于 0.1 至 1.0 之间，因此如果溶液或凝胶中的 DNA 浓度较低，请注意选择合适的稀释倍数。

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WG 或 Buffer WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 将水浴锅的温度设置为 50°C（仅凝胶 DNA 回收试剂盒需要）。
4. 扫描以下二维码观看操作视频：



凝胶 DNA 回收试剂盒



DNA 纯化试剂盒

操作流程图示

凝胶 DNA 回收试剂盒

切胶 (≤500 mg) 装入离心管

加入 500 μl Buffer G
50°C 水浴至凝胶完全溶解

加入 200 μl 异丙醇
混合均匀

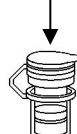
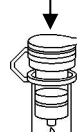
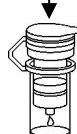
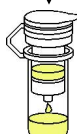
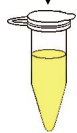
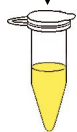
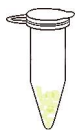
离心滤过核酸纯化柱

加入 500 μl Buffer WS 洗涤纯化柱

加入 700 μl Buffer WG 洗涤纯化柱
重复一次 Buffer WG 洗涤

高速空离甩干

加入 25–30 μl Buffer TE
洗脱 DNA



DNA 纯化试剂盒

PCR 产物或 DNA 溶液

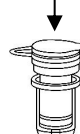
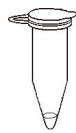
加入 5 倍体积的 Buffer P
混合均匀

离心滤过核酸纯化柱

加入 700 μl Buffer WB 洗涤纯化柱

高速空离甩干

加入 30–50 μl Buffer TE
洗脱 DNA



凝胶 DNA 回收试剂盒操作步骤

1. 在紫外灯下将含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶 (≤ 500 mg) 切下, 转移到一个自备的 1.5 ml 离心管中。

- * 尽量减少多余的凝胶体积, 或者将凝胶块切碎, 可缩短溶胶时间。
- * 凝胶重量不应超过 500 mg, 否则会堵塞纯化柱或影响 DNA 的回收效率。如果估计凝胶块体积大于 500 mg (相当于 500 μ l 体积的凝胶块), 请按照说明书第 10 页“附录 1”内容操作。

2. 加入 500 μ l Buffer G, 50°C 水浴直至凝胶完全溶解 (约 10 分钟左右)。

- * 也可在常温下溶解, 但需要持续地翻转离心管以加速凝胶的溶解。
- * 凝胶体积越大, 溶解所需的时间越长; 如果凝胶浓度大于 2%, 也会需要更多时间。
- * 溶胶的过程中每隔 2-3 分钟翻转几次离心管以帮助凝胶溶解, 并观察凝胶是否彻底溶解。
- * Buffer G 中所添加的染料可帮助观察凝胶是否彻底溶解, 同时可指示 pH 值, 溶胶时如果溶液变为紫红色, 则应加入 10 μ l 3 M 乙酸钠 (pH 5.2) 使溶液恢复至黄色, 否则将影响 DNA 结合到纯化柱上。
- * 凝胶体积大于 300 mg 时, 由于染料稀释的原因, 溶液颜色会与凝胶颜色较为接近, 难以判断凝胶是否彻底溶解, 可用移液器吸注溶胶液, 观察是否有小块凝胶残留。

3. 加入 200 μ l 异丙醇, 混合均匀。

- * 如果回收的 DNA 片段在 500 bp~4 kb 之间, 可省略本步骤。

4. 将溶胶液转移到核酸纯化柱中 (核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中), 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

- * 如果溶胶液体积大于 800 μ l, 应分两次离心过柱。
- * 如果凝胶重量超过 300 mg 或浓度 $\geq 2\%$, 可能会由于溶胶液太粘稠而出现无法全部滤过纯化柱的情况, 此时可用最高速再离心 1 分钟。
- * 滤液无须彻底弃尽, 如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染, 可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WS, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

- * 此步骤为了去除残留的微量琼脂糖分子, 如果回收的 DNA 不用于测序、体外转录或微注射实验, 可省略本步骤。

6. 在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WG, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

- * 如果回收的 DNA 是用于盐敏感的实验, 例如平末端连接实验或直接测序, 推荐在加入 Buffer WG 后室温静置 3-5 分钟后再离心。
- * 确认在 Buffer WG 中已经加入无水乙醇。

7. 重复步骤 6 一次。

8. 14000 rpm 离心 1 分钟。

- * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 则用最高速离心 2 分钟。
- * 请勿省略该步骤, 否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 收集管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 收集管中, 在纯化柱的膜中央加入 25-30 μ l Buffer TE, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒洗脱 DNA。

- * 如果用去离子水洗脱 DNA, 应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5, 否则将影响 DNA 的洗脱效率。

10. 弃纯化柱, 洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验; 或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

DNA Gel Extraction Kit Protocol

1. Excise less than 500 mg gel slice containing the DNA fragment with a clean scalpel or razor blade under ultraviolet lamp and transfer to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

* Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose to reduce dissolve time.

* The gel weight should not exceed 500 mg, otherwise it will block the spin column.

2. Add 500 µl Buffer G, incubate at 50°C until gel slice is completely dissolved(about 10 minutes).

* The dissolution time will increase as the volume of the gel increases. For >2% agarose gels, more dissolution time is required.

* Mix the tube by inversion every 2-3 minutes to help dissolve gel.

* Check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer G without dissolved agarose). If the color of the mixture is violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and mix, the color of the mixture will turn yellow.

* If more than 300 mg was used, it will be difficult to judge whether the gel is completely dissolved. Use a pipette to aspirate the liquid carefully and observe if there is any residual gel.

3. Add 200 µl isopropanol and mix thoroughly.

* If the DNA fragment is between 500 bp and 4 kb, this step can be omitted.

4. Transfer the mixture into the spin column (the spin column is placed in a 2 ml collection tube), closed the lid and centrifuge at 12000 rpm for 30 s. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

* For mixture volumes of more than 800 µl, it should be centrifuged through the column in two batches.

* If the gel weight exceeds 300 mg or the concentration is $\geq 2\%$, maybe it needs to be centrifuged at full speed for 1 min again.

5. Add 500 µl Buffer WS into the spin column, closed the lid and centrifuge at 12000 rpm for 30 s. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

* This step is to remove the residual trace agarose molecules. If the recovered DNA is not for sequencing, in vitro transcription or microinjection experiments, this step can be omitted.

6. Add 700 µl Buffer WG, closed the lid and centrifuge at 12000 rpm for 30 s. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

* If the recovered DNA is used for salt sensitive experiments, such as blunt-end ligation experiment or sequencing, it is recommended to add Buffer WG and stand at room temperature for 3-5 minutes before centrifugation.

* Ensure ethanol has been added into Buffer WG.

7. Repeat step 6 once.

8. Centrifuge at 14000 rpm for 1 min.

* If the centrifuge does not reach 14,000 rpm, centrifuge at full speed for 2 min.

* Do not pass over this step, or the residual ethanol in the eluted DNA will affects the final applications.

9. Discard the collection tube, place the spin column into a cleaning 1.5 ml collection tube, add 25-30 µl Buffer TE to the center of the column membrane, close the lid and incubate at room temperature for 1 min, and centrifuge at 12000 rpm for 30 s.

* The deionized water can also be used to elute DNA, but the pH value should be within 7.0 - 8.5, otherwise it may affect the elution efficiency.

10. Discard the spin column, the eluted DNA can be used for molecular biology experiment immediately, or store the DNA at -20°C.

DNA 纯化试剂盒操作步骤

1. 向 PCR 产物或需要清洁的 DNA 溶液中加入 5 倍体积的 Buffer P，勿弃吸头，直接用移液器吸打几次混匀，并将混合液转移到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 例如需要清洁 100 μ l PCR 产物，则需要加入 500 μ l Buffer P。

* PCR 产物中若含石蜡油，无需去除，也无需计入样品的体积。

* 适合清洁的 DNA 溶液包括酶促反应液（如酶切反应、连接反应等）；经 RNA 酶处理的 DNA 溶液（可去除降解的 RNA）；以及酚/氯仿抽提所获取的含有杂质的 DNA。

* Buffer P 中所添加的染料可指示 pH 值，如果向样品中加入 Buffer P 后溶液变为紫红色，说明需要清洁的 DNA 溶液碱性过强，应加入约 10 μ l 3 M 乙酸钠（pH 5.2）使溶液恢复至原来的黄色，否则将影响 DNA 结合到纯化柱上。

2. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

3. 在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

4. 14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的核酸中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

5. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 30—50 μ l Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒洗脱 DNA。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，建议将洗脱 DNA 的条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以防止 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

* 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

6. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

DNA Purification Kit Protocol

1. Add 5 times the volume of Buffer P to 1 volume of the PCR sample or the DNA solution that needs to be cleaned. Do not discard the tip, pipette several times to mix well, transfer the mixture to the spin column (the spin column is placed in a 2 ml collection tube), closed the lid, centrifuge at 12000 rpm for 30 s.

* For example, add 500 μ l Buffer P for every 100 μ l PCR sample.

* If the PCR sample contains mineral oil, it does not need to be removed or included in the sample volume.

* DNA solutions for cleaning include enzymatic reaction solutions (such as enzyme digestion reactions, ligation reactions, etc.), RNase-treated DNA solutions (which can remove degraded RNA) and DNA containing impurities obtained by phenol/chloroform extraction.

* The dye added in Buffer P can indicate the pH. If the mixture turn to violet after adding Buffer P to the sample, add 10 μ l of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and mix, the color of the mixture will turn yellow, otherwise DNA adsorption will be inefficient.

2. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

3. Add 700 μ l Buffer WB to the spin column, closed the lid, centrifuge at 12000 rpm for 30 s. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

* Ensure ethanol has been added into Buffer WB.

4. Centrifuge at 14000 rpm for 1 min.

* If the centrifuge does not reach 14,000 rpm, centrifuge at full speed for 2 min.

* Do not pass over this step, or the residual ethanol in the eluted DNA will affects the final applications.

5. Discard the collection tube, place the spin column into a cleaning 1.5 ml centrifuge tube, add 30-50 μ l Buffer TE to the center of the column membrane, close the lid and incubate at room temperature for 1 min, and centrifuge at 12000 rpm for 30 s.

* The deionized water can also be used to elute DNA, but the pH value should be within 7.0 - 8.5, otherwise it may affect the elution efficiency.

6. Discard the spin column, the eluted DNA can be used for molecular biology experiment immediately, or store the DNA at -20°C.

常见问题分析

1. 回收不到 DNA 或者 DNA 的回收效率低

可能的原因：

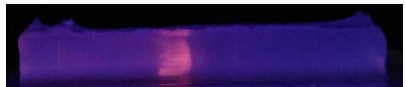
- 1) Buffer WG 或 Buffer WB 中未加入无水乙醇，应按比例补加无水乙醇。如果是错误地加入了其他试剂，请向我公司技术部寻求帮助。
- 2) DNA 的洗脱效率差。参考第 3 页柱纯化技术中的第 4)项“洗脱 DNA”内容优化 DNA 的洗脱方案。
- 3) 将溶液加入到纯化柱前应观察 Buffer G 或 Buffer P 是否保持着原有的黄色，如果溶液变为紫红色，必须加入约 10 μ l 3 M 乙酸钠 (pH 5.2) 使溶液恢复至原来的黄色，否则将严重影响 DNA 结合到纯化柱上。
- 4) 直接将回收前和回收后的 DNA 溶液以测量 OD₂₆₀ 的方法估算回收率。回收前的 DNA 溶液中含有一些在 OD₂₆₀ 处有高吸收峰的杂质（例如 PCR 产物中含有的引物、dNTPs、非特异性扩增产物；质粒（特别是 OD_{260/280}≥1.9 的质粒）及其酶切产物或其他需要清洁的 DNA 溶液中含有降解的 RNA 或 DNA 等），而经过回收或纯化后会去除这些杂质，导致 OD₂₆₀ 处吸收峰大幅度降低，因此用这种方法估算出的 DNA 回收率会严重偏低。
- 5) 当加载到纯化柱上的 DNA 过少时，纯化柱的吸附效率会变差，导致 DNA 的回收效率变低。请适当增加起始 DNA 的用量，确保有足够量的 DNA（推荐≥1 μ g，排除引物、RNA 等杂质干扰的真实值）加载到纯化柱上。**如果是凝胶 DNA 回收试剂盒，则推荐电泳加样时加入更多用量的 DNA，因为电泳时间过长、凝胶不够饱满等因素会导致 DNA 在电泳过程中大量损失。**

仅凝胶回收：

- 6) 制作的凝胶从加样孔至 DNA 泳动方向呈现为一个降低的斜面，导致 DNA 在电泳的过程中大量地流失到电泳缓冲液中（如图一）。制作琼脂糖凝胶时应注意放平制胶槽，并加入足够量的凝胶液（如图二）；如果有可能，尽量减少电泳时间。（详细情况参考 simgenbio 微信公众号文章“为什么我从凝胶中回收 DNA 的效率那么低？”）



图一



图二

- 7) 凝胶没有完全被溶解，DNA 仍保留在未溶解的凝胶中。在 50°C 溶胶时每隔 2-3 分钟请将离心管旋涡振荡数秒以帮助凝胶溶解。
- 8) 在凝胶溶解后的溶液中加入异丙醇出现雾状沉淀。出现该种现象主要是因为凝胶没有被彻底溶解，此时应注意不要省略后续的 Buffer WS 洗涤步骤，并且加入 Buffer WS 到纯化柱中后室温静置 1 分钟，以增强对未溶解的凝胶的洗涤效果。

2. 回收的 DNA 生物学活性差

- 1) 回收的 DNA 中盐残留量过高。向纯化柱中加入 Buffer WG 或者 Buffer WB 后，室温静置 3-5 分钟再离心，可最大程度地洗去纯化柱上残留的盐分。
- 2) 回收的 DNA 中乙醇残留量过高。注意不可省略高速空离（14000 rpm 离心 1 分钟）步骤。

附录 1：用凝胶 DNA 回收试剂盒从大于 500 mg 的凝胶中回收 DNA

- 1. 在紫外灯下将含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶切下，转移到一个自备的 15 ml 离心管中。**
 - * 如果凝胶块体积较大，可将凝胶块切碎，以加快后续凝胶溶解的速度。
- 2. 称量切下的凝胶重量，加入 3 倍体积的 Buffer G（每 1 mg 凝胶换算为 1 μ l 凝胶体积）。**
 - * 例如 600 mg 凝胶，应加入 1.8 ml Buffer G。
 - * 如果凝胶浓度大于 2%，则应加入 6 倍体积的 Buffer G。
 - * Buffer G（Cat. No.: B006-01/B006-02）可单独订购。
- 3. 将装有凝胶的离心管 50°C 水浴直至凝胶完全溶解（大约 5-10 分钟）。**
 - * 溶解的过程中每隔 2-3 分钟翻转几次离心管以帮助凝胶溶解，并观察凝胶是否彻底溶解。
 - * Buffer G 中所添加的染料可帮助观察凝胶是否彻底溶解，同时可指示 pH 值，溶胶时如果溶液变为紫红色，则应加入 10 μ l 3 M 乙酸钠（pH 5.2）使溶液恢复至黄色，否则将影响 DNA 结合到纯化柱上。
- 4. 加入 1 倍凝胶体积的异丙醇，混合均匀。**
 - * 如果回收的 DNA 片段在 500 bp-4 kb 之间，可省略本步骤。
 - * 例如从 600 mg 凝胶中回收 DNA，应加入 600 μ l 异丙醇。
 - * 如果从大于 2% 的凝胶中回收 DNA，则应加入 2 倍凝胶体积的异丙醇。
- 5. 吸取 800 μ l 溶胶液到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。分多次将溶胶液全部滤过核酸纯化柱。**
 - * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸上倒扣拍击一次。
- 6. 在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WS，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。**
 - * 此步骤为了去除残留的微量琼脂糖分子，如果回收的 DNA 不用于测序、体外转录或微注射实验，可省略本步骤。
- 7. 在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WG，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。**
 - * 如果回收的 DNA 是用于盐敏感的实验，例如平末端连接实验或直接测序，推荐在加入 Buffer WG 后室温静置 3-5 分钟后再离心。
 - * 确认在 Buffer WG 中已经加入无水乙醇。
- 8. 重复步骤 7 一次。**
- 9. 14000 rpm 离心 1 分钟。**
 - * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。
 - * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。
- 10. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 收集管中，在纯化柱的膜中央加入 25-30 μ l Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒洗脱 DNA。**
 - * 如果用以去离子水洗脱 DNA，应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。
- 11. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。**

附录 2：用凝胶 DNA 回收试剂盒清洁回收 DNA

1. 向 PCR 产物或需要清洁的 DNA 溶液中加入 3 倍体积的 Buffer G。

- * 例如需要清洁 100 μ l PCR 产物，则应加入 300 μ l Buffer G。
- * PCR 产物中若含石蜡油，无需去除，也无需计入样品的体积。
- * 适合清洁的 DNA 溶液包括酶促反应液（如酶切反应、连接反应等）；经 RNA 酶处理的 DNA 溶液（可去除降解的 RNA）；以及酚/氯仿抽提后获取的 DNA。
- * Buffer G 中所添加的染料可指示 pH 值，如果向样品中加入 Buffer G 后溶液变为紫红色，则应加入 10 μ l 3 M 乙酸钠（pH 5.2）使溶液恢复至原来的颜色，否则将影响 DNA 结合到纯化柱上。

2. 加入 1 倍需要清洁的 DNA 溶液体积的异丙醇，混合均匀。

- * 如果清洁的 DNA 片段在 500 bp~4 kb 之间，可省略本步骤。
- * 例如需要清洁 100 μ l PCR 产物，则应加入 100 μ l 异丙醇。

3. 将混合液转移到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

- * 如果混合液体积大于 800 μ l，应分多次离心过柱。

4. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，加入 500 μ l Buffer WS，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

- * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，加入 700 μ l Buffer WG，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

- * 确认在 Buffer WG 中已经加入无水乙醇。

6. 重复步骤 5 一次。

- * 两次 Buffer WG 洗涤能更有效地降低纯化柱上盐分的残留，请勿省略。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，盖上管盖，14000 rpm 离心 1 分钟。

- * 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。
- * 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

8. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 收集管中，在纯化柱的膜中央加入 25—30 μ l Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒洗脱 DNA。

- * 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

9. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

附录 3：用 DNA 纯化试剂盒从蛋白酶 K 消化产物中回收 DNA

1. 向蛋白酶 K 消化产物中加入 5 倍体积的 Buffer P，勿弃吸头，直接用移液器吸打几次混匀，并将混合液转移到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 例如需要清洁 100 μ l 蛋白酶 K 消化产物，则需要加入 500 μ l Buffer P。

* 如果从毛发、血迹等含微量 DNA 的蛋白酶 K 消化产物中回收 DNA 时，请补加适量的 Carrier RNA (Cat. No.: 4003101) 以提高 DNA 的回收效率，或者选用微量 DNA 清洁试剂盒 (Cat. No.: 2103050)

* 如果样本较为新鲜，并且 DNA 含量较高，我们建议将纯化柱更换为基因组 DNA 专用纯化柱 (Cat. No.: 7201050) 以提高 DNA 的回收效率。

2. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸上倒扣拍击一次。

3. 在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

* 确认在 Buffer WB 中已经加入无水乙醇。

4. 14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的核酸中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

5. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 30—50 μ l Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒洗脱 DNA。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

* 如果是用基因组 DNA 专用纯化柱纯化 DNA，请加 100—200 μ l Buffer TE 洗脱 DNA。

* 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

6. 弃纯化柱，洗脱的 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 DNA 储存于 -20°C 备用。

使用 Simgen 凝胶 DNA 回收试剂盒发表的部分论文

1. Huang Y, Feng H, Lu H, et al. Novel 16S rDNA primers revealed the diversity and habitats-related community structure of sphingomonads in 10 different niches[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(7): 877-889.
2. Chen J, He Y, Wu Y, et al. Single Ethanol withdrawal regulates extrasynaptic δ -GABAA receptors via PKC δ activation[J]. Frontiers in molecular neuroscience, 2018, 11: 141.
3. Guo L, Song Y, Yuan Y, et al. Identification of nucleic acid aptamers against lactate dehydrogenase via SELEX and high-throughput sequencing[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(17): 4427-4439.
4. Wang P, Jia X, Xiao X, et al. An early diagnostic clue for COL18A1-and LAMA1-associated diseases: high myopia with alopecia areata in the cranial midline[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 644947.
5. Yao Y, Deng S, Zhu F. Prenatal detection of novel compound heterozygous splice site variants of the KIAA0825 gene in a fetus with postaxial polydactyly type A[J]. Genes, 2022, 13(7): 1230.
6. Fu Y, Chen Q, Xiong M, et al. Clinical performance of nanopore targeted sequencing for diagnosing infectious diseases[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(2): e00270-22.

使用 Simgen DNA 纯化试剂盒发表的部分论文

1. Zhang X H, Liu Z Q, Xue Y P, et al. Activity improvement of a regioselective nitrilase from *Acidovorax facilis* and its application in the production of 1-(cyanocyclohexyl) acetic acid[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(12): 2141-2148.
2. Liu Z Q, Zhang X H, Xue Y P, et al. Improvement of *Alcaligenes faecalis* nitrilase by gene site saturation mutagenesis and its application in stereospecific biosynthesis of (R)-(-)-mandelic acid[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(20): 4685-4694.
3. Huang X, Shi T, Mo K, et al. Monoclonal antibody against premembrane viral protein of avian tembusu virus[J]. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2017, 36(2): 57-61.
4. Huang X, Qiu H, Peng X, et al. Molecular analysis and serological survey of Tembusu virus infection in Zhejiang, China, 2010-2016[J]. Archives of virology, 2018, 163(12): 3225-3234.

更多凝胶电泳相关文章请扫描背面二维码关注 **simgenbio** 微信公众号——“为什么我从凝胶中回收 DNA 的效率那么低？”、“为什么我的凝胶 DNA 回收率低(--续)”、“容易被误读的电泳图”、“怎样做一张漂亮的琼脂糖凝胶电泳图”、“怎样做一张漂亮的琼脂糖凝胶电泳图（续）”、“我的酶切怎么“糊”掉了？”。