

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离心管	5个	50个	250个
1.5 ml离心管	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离心管	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

产品如果储存于常温（0~30℃），可在三年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于2~8℃，可延长产品的有效期至三年以上（2~8℃储存的产品使用前应先使产品恢复到室温后再使用）。

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醋酸钠（pH 5.0）

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15 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DNA回收试剂盒（10-50 kb）（Cat. No.: 2003050）。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和Buffer P加入凝胶块或者DNA溶液中后，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、溴化乙锭、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。如果凝胶或含有DNA的溶液碱性过强，pH指示剂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醋酸钠（pH 5.0），使pH指示剂恢复到原来的黄色。

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、洗涤的过程中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。如果使用国产离心机，可以将离心速度改为8000 rpm以降低噪音；如果使用进口离心机，则可以选择离心机中的“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离心管中，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大于7，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 μ l Buffer G
50°C水浴至凝胶完全溶解

加入 200 μ l 异丙醇
混合均匀

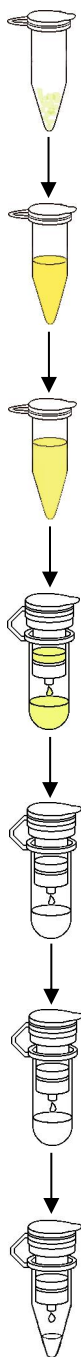
离心滤过核酸纯化柱

加入 500 μ l Buffer WS 洗涤纯化柱

加入 700 μ l 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 μ l Buffer TE
洗脱 DNA



DNA 纯化试剂盒

PCR 产物或 DNA 溶液

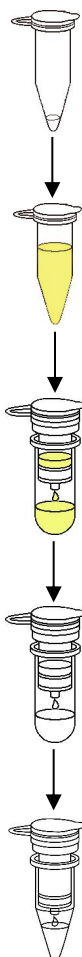
加入 5 倍体积的 Buffer P
混合均匀

离心滤过核酸纯化柱

加入 700 μ l Buffer WB 洗涤纯化柱

高速空离甩干

加入 30–50 μ l 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)。

- * 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醋酸钠 (pH 5.0) 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离心管中), 12000 rpm离心30秒。弃2 ml离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。

- * 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, 如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染, 可将2 ml离心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离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。

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

- * 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2—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离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管 (试剂盒提供) 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 or affect the DNA recovery efficiency.

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 5.0, 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 sample into the spin column (The spin column is placed in a 2 ml collection tube), Centrifuge at 12000 rpm for 30 s. Discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

- * For sample volumes of more than 800 µl, it should be centrifuged through the column twice.
- * 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 to 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 2-5 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 full speed of the centrifuge could not up to 14000 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 centrifuge tube (provided in the kit), add 25-30 µl Buffer TE to the center of the column membrane, close the lid, stand 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 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离心管中），盖上管盖。

- * 比如需要清洁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，如果向样本中加入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醋酸钠（pH 5.0）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. 12000 rpm离心30秒，弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。

- * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。

- * 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离心管，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℃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.

* For example, add 500 µl Buffer P for every 100 µl 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 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.0) and mix, the color of the mixture will turn yellow, otherwise DNA adsorption will be inefficient.

2. Centrifuge at 12000 rpm for 30 s, discard the filtrate and place the spin column back into the collection tube.

3. Add 700 µl 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 full speed of the centrifuge could not up to 14000 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 µl Buffer TE to the center of the column membrane, close the lid, stand 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 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：

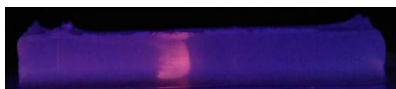
- 1) Buffer WG或Buffer WB中未加入无水乙醇，应按比例补加无水乙醇。如果是错误地加入了其他试剂，请向我公司技术部寻求帮助。
- 2) DNA的洗脱效率差。参考第3页柱纯化技术中的第4)项“洗脱DNA”内容优化DNA的洗脱方案。
- 3) 将溶液加入到纯化柱前应观察Buffer G或Buffer P是否保持着原有的黄色，如果溶液变为紫红色，必须加入约10 μ l 3 M醋酸钠（pH 5.0）使溶液恢复至原来的黄色，否则将严重影响DNA结合到纯化柱上。
- 4) 直接将回收前和回收后的DNA溶液以测量OD₂₆₀的方法估算回收率。回收前的DNA溶液中含有一些在OD₂₆₀处有高吸收峰的杂质（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在泳动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℃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彻底溶解。
- 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的洗涤步骤，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中盐分残留量过高。向纯化柱中加入Buffer WG或者Buffer WB后，室温静置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）。

* 比如600 mg凝胶应加入1.8 ml Buffer G。

* 如果凝胶浓度大于2%，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醋酸钠（pH 5.0）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。

* 比如从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离心管中）。12000 rpm离心30秒，弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。分多次将溶胶液全部滤过核酸纯化柱。

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

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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中。

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

* 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2—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离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的1.5 ml离心管（试剂盒提供）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。

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。

- * 比如需要清洁 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，如果向样本中加入 Buffer G 后溶液变为紫红色，则应加入 10 μ l 3 M 醋酸钠（pH 5.0）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。
- * 比如需要清洁 100 μ l PCR 产物，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 离心管中），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 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，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 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒提供）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℃ 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 离心管中），盖上管盖。

- * 比如需要清洁100 µl蛋白酶K消化产物，则需要加入500 µl 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. 12000 rpm 离心 30 秒，弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中。

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

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

- * 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 离心管，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 µl 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 µl 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℃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？”。